

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**ÉTUDE DU MÉCANISME DE RÉGULATION DE LA CONVERTASE DE  
PROPROTÉINES FURINE EN CONTEXTE TUMORAL ET DE SES IMPLICATIONS  
DANS LE PROCESSUS DE PROGRESSION TUMORALE.**

Par

**STÉPHANIE McMAHON**

Programme d'immunologie

Thèse présentée à la faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph. D.) en Immunologie

Avril 2005



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-14867-9*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-14867-9*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	I
LISTE DES FIGURES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
RÉSUMÉ .....	XII

### INTRODUCTION :

#### 1. LES CONVERTASES DE PROPROTÉINES

1.1 La découverte de la furine.....	1
1.2 La structure des convertases de proprotéines.....	4
1.3 La localisation cellulaire et tissulaire des PC.....	9
1.4 La spécificité de maturation des substrats .....	12
1.5 Les inhibiteurs des convertases de proprotéines.....	19
1.6 L'implication de la furine dans les processus physiologiques et pathologiques	
1.6.1 L'embryogenèse.....	24
1.6.2 Les infections virales et bactériennes.....	26
1.6.3 L'Alzheimer.....	27
1.6.4 Le cancer.....	28
1.7 La régulation de l'expression de la furine.....	34

2. LE CANCER	
2.1 Le processus de progression tumorale.....	37
2.2 Le facteur de transcription HIF-1.....	46
2.2.1 La structure du HIF-1.....	49
2.2.2 L'activation du HIF-1 par l'hypoxie.....	52
2.2.3 L'activation du HIF-1 par des stimuli non-hypoxiques.....	57
2.2.4 Les rôles du HIF-1 dans la tumorigenèse.....	61
2.3 Le facteur de croissance TGFβ1	
2.3.1 L'activation du TGFβ1.....	65
2.3.2 La signalisation par le TGFβ1.....	67
2.3.3 Les rôles du TGFβ1 dans la tumorigenèse.....	70
2.4 Les métalloprotéinases	
2.4.1 La structure des MMP.....	75
2.4.2 L'activation des MMP.....	78
2.4.3 Les rôles des MMP dans la tumorigenèse.....	84
3. LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	90

## RÉSULTATS :

Chapitre I :	<u>McMahon Stéphanie</u> , Marie-Hélène Laprise et Claire M. Dubois
	<b>Alternative pathway for the role of furin in tumor cell invasion process : Enhanced MMP-2 levels through bioactive TGFβ</b>
	<i>Experimental Cell Research</i> , vol. 291, p. 326-339, 2003
	.....92



Chapitre II: <u>McMahon Stéphanie</u> , Francine Grondin, Patrick P. McDonald, Darren E. Richard et Claire M. Dubois <b>Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by Hypoxia-inducible Factor-1 : Impact on the bioactivation of proproteins</b> <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , Vol. 280, No. 8, p. 6561- 6569, 2005	143
Chapitre III: <u>McMahon Stéphanie</u> , Martine Charbonneau, Sébastien Grandmont et Claire M. Dubois <b>TGFβ1 induces HIF-1 through dual mechanisms involving inhibition of PHD2 expression and increase in HIF-1α transcription</b> (soumis en février 2005) <i>The Journal of Biological Chemistry</i>	182
<u>DISCUSSION</u>	226
<u>CONCLUSION</u>	252
<u>REMERCIEMENTS</u>	254
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	256
<u>ANNEXE #1 :</u>	
Accusé de réception de l'article présenté au chapitre III	294
<u>ANNEXE #2 :</u>	
Description des techniques	295

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION :

Figure 1 : Représentation schématique des diverses convertases de proprotéines de mammifères.....	5
Figure 2 : La voie d'activation de la furine.....	6
Figure 3 : Représentation des mutations contenues dans chacun des allèles encodant la furine chez les cellules LoVo.....	8
Figure 4 : Les rôles de la furine dans le processus de progression tumorale.....	33
Figure 5 : L'organisation génétique de la région présente en 5' du gène de la furine humaine.....	35
Figure 6 : Représentation schématique du processus de progression tumorale.....	45
Figure 7 : Représentation schématique des domaines fonctionnels du HIF-1 $\alpha$ et du HIF-1 $\beta$ .....	50
Figure 8 : La régulation du facteur de transcription HIF-1 en normoxie et en hypoxie.....	54
Figure 9 : Comparaison des diverses voies régulant l'expression et l'activité transcriptionnelle du HIF-1.....	62
Figure 10 : Maturation et activation du pro-TGF $\beta$ 1.....	66
Figure 11 : Représentation des voies de signalisation induites par le TGF $\beta$ 1.....	69
Figure 12 : Rôles du TGF $\beta$ 1 dans la carcinogenèse.....	71
Figure 13 : Représentation schématique de la structure protéique des métalloprotéinases de mammifère.....	77
Figure 14 : Représentation de la structure du précurseur de la métalloprotéinase MT1-MMP humaine.....	80
Figure 15 : Représentation schématique de l'activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP.....	82

## CHAPITRE I :

Figure 1 : Furin reconstitution in LoVo cells increases invasion.....	123
Figure 2 : Involvement of MMPs in furin-induced invasion.....	124
Figure 3: Involvement of MT1-MMP in furin-induced invasion.....	125
Figure 4: A role for TGF $\beta$ 1 in furin-induced invasion.....	126
Figure 5: Effect of TGF $\beta$ 1 on MT1-MMP production.....	127
Figure 6: A role for TGF $\beta$ 1 in furin-induced invasion mediated by MMP-2.....	128
Figure 7: Schematic diagram of the role of furin in the invasion process of tumor cells.....	129

## CHAPITRE II:

Figure 1: Expression of furin in hypoxic conditions.....	168
Figure 2: Effect of hypoxia on <i>fur</i> P1, P1A and P1B promoter activity.....	169
Figure 3: Functional analysis of <i>fur</i> P1 5'-deletion constructs.....	170
Figure 4: Regulation of <i>fur</i> P1 and P1-NheI promoters by hypoxia and HIF-1.....	171
Figure 5: Functional analysis of HIF-1 binding sites within <i>fur</i> P1-NheI promoter region.....	172
Figure 6: Analysis of HIF-1 binding to HREs within <i>fur</i> P1 promoter.....	173
Figure 7: Biological impact of hypoxia/HIF-1-induced furin gene expression.....	174
Figure 8: Proposed impacts of <i>fur</i> hypoxia-induced expression.....	175

## CHAPITRE III:

Figure 1: Induction of HIF-1 $\alpha$ protein in response to TGF $\beta$ 1.....	210
Figure 2: TGF $\beta$ 1 increases HIF-1 $\alpha$ mRNA expression.....	211

Figure 3: TGF $\beta$ 1 decreases PHD2 expression and activity.....	212
Figure 4: TGF $\beta$ 1 effects are mediated by MAPK p42/44, p38, PI3K and Smads.....	213
Figure 5: Inhibition of TGF $\beta$ 1 maturation decreases basal HIF-1 $\alpha$ protein and mRNA expression.....	214
Figure 6: Cells deficient for HIF-1 $\alpha$ produce decreased VEGF levels in response to TGF $\beta$ 1.....	215
Figure 7: Schematic diagram of the mechanisms by which TGF $\beta$ 1 regulates HIF-1 $\alpha$ .....	216

## DICUSSION :

Figure 16 : Résumé des rôles de la furine dans la tumorigenèse selon les travaux réalisés aux chapitres I, II et III de cette thèse.....	246
Figure 17 : Représentation schématique des mécanismes de régulation de la furine dans le contexte tumoral.....	248

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **INTRODUCTION :**

Tableau I :	Localisation cellulaire et tissulaire des convertases de proprotéines.....	11
Tableau II :	Classification fonctionnelle de précurseurs maturés par les convertases de proprotéines.....	13
Tableau III :	Les phénotypes associés à la déficience en convertases de proprotéines chez la souris.....	18
Tableau IV :	Efficacité du peptide Dec-RVKR-CH <sub>2</sub> Cl à inhiber <i>in vitro</i> l'activité enzymatique des convertases de proprotéines de mammifères.....	21
Tableau V :	Efficacité de la serpine modifiée $\alpha$ 1-antitrypsine PDX à inhiber <i>in vitro</i> l'activité enzymatique des convertases de proprotéines de mammifères .....	21
Tableau VI :	Expression des convertases de proprotéines chez différents cancers humains et lignées de cellules tumorales.....	29
Tableau VII :	Liste non-exhaustive de gènes dont l'expression est régulée par le facteur de transcription HIF-1 .....	47
Tableau VIII :	Liste des MMP les plus fréquemment impliquées dans le cancer et leurs substrats.....	85

### **CHAPITRE I :**

Table 1 :	Involvement of metalloproteinases in TGF $\beta$ bioactivation.....	122
-----------	---	-----

### **CHAPITRE II:**

Table I:	Measure of bioactive TGF $\beta$ 1 from hypoxia-stimulated Hepa-1 c1c7 and c4 cells.....	167
----------	--	-----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\alpha$ 1-PDX:	$\alpha$ 1-antitrypsine Portland
$\alpha$ 2M:	$\alpha$ 2-macroglobuline
ACTH:	<i>adrenocorticotropin hormone</i>
ADN:	acide désoxyribonucléique
ARNT:	<i>aryl hydrocarbon nuclear transporter</i>
ARNm:	acide ribonucléique messenger
BACE:	<i>beta site amyloid precursor protein cleaving enzyme</i>
bFGF:	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bHLH:	hélice-boucle-hélice basique
BMP:	<i>bone morphogenic protein</i>
BDNF:	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CDK:	kinase dépendante des cyclines
CLAC:	<i>collagen-like Alzheimer amyloid plaque component</i>
4E-BP:	<i>4E-binding protein</i>
EGF:	<i>epidermal growth factor</i>
Egl-9:	<i>egg-laying abnormal phenotype-9</i>
eIF-4F:	<i>eucaryote initiation factor-4F</i>
Epo:	érythropoïétine
<i>fur</i> :	fes/fps upstream region
FIH:	facteur inhibiteur de HIF-1
GM-CSF:	<i>granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>

GNSO:	s-nitrosoglutathione
HAS:	<i>HIF-1 ancillary sequence</i>
HBS:	<i>hypoxia-binding sequence</i>
HRE:	<i>hypoxia-response element</i>
HIF-1:	<i>hypoxia-inducible factor-1</i>
HGF:	<i>hepatocyte growth factor</i>
IGF:	<i>insulin-like growth factor</i>
IGFR:	<i>insulin-like growth factor receptor</i>
IL-1:	interleukine-1
IL-2:	interleukine-2
IL-8:	interleukine-8
INOS:	synthase d'oxyde nitrique inductible
kDa:	kilo Dalton
KEX2 :	gène encodant la kexine de levure
$K_i$ :	constante d'inhibition
LPC :	<i>lymphoma protein convertase</i>
LPH :	<i>lipoprotein hormone</i>
LPS :	lipopolysaccharide
MAPK :	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEC :	matrice extracellulaire
MMP :	métalloprotéinase de la matrice
MT-MMP :	<i>membrane-type matrix metalloproteinase</i>
mTOR :	<i>mammalian target of rapamycin</i>

NARC-1:	<i>neural apoptosis-regulated convertase-1</i>
NGF:	<i>nerve growth factor</i>
NLS :	séquence de localisation nucléaire
NO :	oxyde nitrique
ODDD :	<i>oxygen-dependent degradation domain</i>
PAS :	domaine Per-ARNT-Sim
PACE :	<i>paired-basic amino acid cleavage enzyme</i>
PAI-1 :	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
pb :	paire de bases
PC :	convertase de proprotéines
PCR :	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF :	<i>platelet-derived growth factor</i>
PHD:	<i>prolyl hydroxylase-domain containing protein</i>
PI3K :	phosphoinositide 3-OH kinase
PI8 :	<i>proteinase inhibitor 8</i>
PKC :	protéine kinase C
PMA :	phorbol 12-myristate 13-acétate
POMC :	pro-opiomelanocortine
PTEN :	<i>phosphatase and tensin homologue tumor suppressor</i>
pVHL :	protéine von Hippel Lindau
RE :	réticulum endoplasmique
SDS :	sodium dodecyl sulfate
siRNA :	<i>small interfering ribonucleic acid</i>



SKI-1:	<i>subtilisin-kexin isoenzyme</i>
Smad :	<i>similar to mothers against decapentaplegic</i>
TAD:	domaine de transactivation
TβRI et II :	récepteurs de type I et II du TGFβ
TGFα:	<i>transforming growth factor alpha</i>
TGFβ :	<i>transforming growth factor beta</i>
TIMP:	<i>tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>
TNFα:	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
tPA:	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
uPA:	<i>urokinase plasminogen activator</i>
uPAR:	<i>urokinase plasminogen activator receptor</i>
VEGF :	<i>vascular endothelial growth factor</i>

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**ÉTUDE DU MÉCANISME DE RÉGULATION DE LA CONVERTASE DE  
PROPROTÉINES FURINE EN CONTEXTE TUMORAL ET DE SES  
IMPLICATIONS DANS LE PROCESSUS DE PROGRESSION TUMORALE.**

Par

**Stéphanie McMahon**

Programme d'immunologie

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
*Philosophiae Doctor (Ph.D.)* en Immunologie

**RÉSUMÉ**

Des différences au niveau structural et biochimique distinguent les cellules normales des cellules cancéreuses. Bien qu'il existe une grande hétérogénéité entre les types de cancers, des caractéristiques phénotypiques sont partagées. Celles-ci incluent l'acquisition des capacités de croissance excessive, d'invasion et d'angiogenèse.

Ces comportements découlent généralement de la production de protéines en concentrations anormales ou douées d'une activité anormale. Parmi celles-ci, on retrouve des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des molécules responsables de l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice ainsi que des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire. Plusieurs de ces facteurs sont synthétisés sous une forme de précurseur inactif qui requiert un clivage endoprotéolytique permettant le relâchement d'une forme

mature et biologiquement active. La furine, le prototype de la famille des convertases de proprotéines de mammifères, possède la capacité de cliver plusieurs de ces médiateurs qui ont une importance majeure dans la tumorigenèse.

Diverses lignées de cellules tumorales et cancers humains expriment des niveaux élevés de furine. Des études indiquent que l'activité de la furine corrèle avec l'agressivité des cancers, ce qui suggère que cette convertase influence le comportement malin des cellules tumorales. Cependant, peu de mécanismes d'action ont été décrits, et peu d'informations sont disponibles concernant la régulation de l'expression de cette convertase en condition tumorale.

Dans cette thèse, nous avons d'abord approfondi le rôle de la furine dans le processus d'invasion tumorale. Pour ce faire, nous avons étudié la capacité d'invasion *in vitro* des cellules humaines LoVo, une lignée d'adénocarcinome de colon déficiente en furine active. La complémentation génétique de ces cellules avec de la furine de type sauvage a induit une augmentation de la capacité invasive. Cette augmentation est attribuable à la production de TGF $\beta$ 1 bioactif, un substrat reconnu de la furine, qui régule à la hausse les niveaux de la métalloprotéinase MMP-2. Nos résultats démontrent également que l'activation du TGF $\beta$ 1 est sous l'influence de la MMP-2, ce qui indique que la furine augmente l'invasion tumorale en établissant une boucle d'amplification/activation entre la MMP-2 et le TGF $\beta$ 1.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à comprendre les mécanismes qui régissent l'expression de la furine en condition tumorale. Nous avons observé que l'hypoxie, un élément caractéristique du microenvironnement des tumeurs solides en croissance, induit l'expression de la furine via le facteur de transcription HIF-1, un complexe transcriptionnel qui joue un rôle clé dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie. La régulation de cette convertase par l'hypoxie/HIF-1 a été corrélée avec une augmentation de l'activation protéolytique des substrats pro-tumorigéniques MT1-MMP et TGF $\beta$ 1. Ainsi, ces travaux mettent en lumière un nouveau mécanisme de régulation de l'expression de la furine qui se traduit par l'augmentation de la disponibilité de facteurs pro-tumorigéniques actifs.

Enfin, des études récentes indiquent que le TGF $\beta$ 1 augmente l'expression de la sous-unité régulable du HIF-1, le HIF-1 $\alpha$ , ainsi que l'activité de liaison à l'ADN du HIF-1. Ainsi, nous avons étudié les mécanismes d'action impliqués dans cette régulation qui consistent en la synthèse d'ARNm et l'augmentation de la stabilité du HIF-1 $\alpha$  par le TGF $\beta$ 1. Plus particulièrement, nous démontrons que le TGF $\beta$ 1 diminue, de façon marquée, les niveaux d'ARNm et de la protéine encodant la PHD2, une prolyl hydroxylase associée à HIF-1 $\alpha$ , ce qui occasionne une inhibition de la dégradation du HIF-1 $\alpha$ . De plus, nos travaux démontrent que la production endogène de TGF $\beta$ 1 bioactif, par la furine, module efficacement l'expression de gènes cibles par le HIF-1.

Conjointement, ces résultats appuient l'hypothèse voulant que la maturation/activation de proprotéines contribue au développement tumoral. Étant donné la panoplie de substrats

pouvant être activés par la furine, des études supplémentaires seraient nécessaires afin de discerner les rôles relatifs à cette convertase dans les différentes étapes de la progression tumorale.

## **INTRODUCTION:**

### **1. LES CONVERTASES DE PROPROTÉINES**

#### **1.1 La découverte de la furine**

C'est au 17<sup>e</sup> siècle que Anton Van Leeuwenhoek fit la découverte des premières structures cellulaires (bactéries et spermatozoïdes) et utilisa le terme cellule pour la première fois. Ce ne fut toutefois qu'au début des années 1800 qu'on réalisa l'importance universelle des cellules dans la composition des organismes vivants (Albert et al., 2002). Depuis, nombre de chercheurs se sont investis à comprendre les phénomènes qui permettent le maintien, la régulation et la spécialisation des fonctions cellulaires. La complexité de ces fonctions, d'abord régie par le répertoire génétique, est assurée grâce à différentes stratégies. Celles-ci incluent la diversité au niveau des gènes, mais également au niveau des protéines qui subissent une grande variété de modifications post-traductionnelles qui leur confèrent une activité biologique. Vers la fin des années 1960, deux équipes indépendantes de chercheurs ont observé que des hormones telles que l'insuline et la  $\gamma$ -LPH sont issues respectivement des molécules précurseurs proinsuline et  $\beta$ -LPH (Chretien and Li, 1967; Steiner et al., 1967). Le séquençage de ces dernières a permis de démontrer que les hormones biologiquement actives sont relâchées par excision de la molécule précurseur (proprotéine) suivant un clivage post-traductionnel du côté C-terminal d'un motif consistant en une paire d'acides aminés basiques (K-R↓ ou R-R↓). Suite à ces observations, plusieurs laboratoires ont travaillé à l'identification de(s) enzyme(s) ayant une affinité pour ces types de séquences basiques.

Au cours des années 1980, une famille d'enzymes responsables de la maturation de plusieurs hormones et propeptides fut découverte. La mise en évidence de cette famille d'enzymes nommée convertases de proprotéines (PC) découle de recherches effectuées avec la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ces recherches ont mené à la découverte d'une enzyme nommée kexine, encodée par le gène *KEX2* (Julius et al., 1984). Les études de caractérisation de cette enzyme ont démontré que celle-ci fait partie de la famille des protéases de type sérine, dépendantes du calcium et apparentées à la famille des subtilisines de bactéries (Mizuno et al., 1988; Mizuno et al., 1989). Le rôle physiologique de la kexine a été établi grâce à des analyses de complémentation génétique de souches de levures mutantes pour le gène *KEX2* qui présentaient des défauts dans la production du facteur  $\alpha$ -mating et de la toxine « tueuse », deux produits générés par le clivage intracellulaire de molécules précurseurs suivant des sites dibasiques (Fuller et al., 1988). Par la suite, des études portant sur l'activité enzymatique ont permis de démontrer que la kexine est capable de cliver des précurseurs protéiques de mammifères *in vitro*, tel que la pro-albumine (Bathurst et al., 1987) et *in vivo*, soit la pro-opiomélanocortine (Thomas et al., 1988). À la lumière de ces résultats, les chercheurs ont proposé l'existence d'homologues de la kexine chez les cellules de mammifères pouvant exercer la fonction de convertase de proprotéines.

La disponibilité de la séquence du gène de la kexine et des analyses d'alignements d'acides aminés de son site catalytique ont permis la découverte du premier homologue de la kexine chez les mammifères, soit la furine (Fuller et al., 1989; van den Ouweland et al., 1990). Cette endoprotéase apparentée à la kexine de levures et aux subtilisines de

bactéries est encodée par le gène *fur* dont l'acronyme est tiré de sa position en amont du proto-oncogène *c-fes/fps* (*c-fes/fps upstream region*) sur le chromosome 15q25q26.1 (Roebroek et al., 1986a; Roebroek et al., 1986b). Subséquemment, à l'aide de stratégies basées sur la technique de PCR, plusieurs autres convertases de proprotéines de mammifères ont été identifiées et caractérisées. Jusqu'à présent, 7 membres de cette famille de protéases présentant la capacité de cliver des substrats suivant une paire d'acides aminés basiques ont été répertoriés, soit la furine (aussi nommée PACE), la PC1 (aussi nommée PC3) (Seidah et al., 1990; Smeekens et al., 1991), la PC2 (Seidah et al., 1990; Smeekens and Steiner, 1990), la PACE4 (Kiefer et al., 1991), la PC4 (Nakayama et al., 1992; Seidah et al., 1992), la PC5 (aussi nommée PC6) (Lusson et al., 1993; Nakagawa et al., 1993a) et la PC7 (aussi nommée PC8 ou LPC) (Bruzzaniti et al., 1996; Meerabux et al., 1996; Seidah et al., 1996). La furine est considérée en tant que prototype de la famille de convertases de mammifères puisqu'elle a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis une caractérisation approfondie de l'enzyme.

Plus récemment, deux autres convertases de proprotéines de mammifères ont été identifiées, soit la SKI-1/S1P (Elagoz et al., 2002; Seidah et al., 1999) et la NARC-1 (Abifadel et al., 2003; Seidah et al., 2003). Ces convertases sont impliquées dans le métabolisme du cholestérol et présentent une spécificité de reconnaissance de motifs non-basiques dont la séquence consensus est [R/K]-X-[Hydrophobique]-Z↓ dans laquelle Z représente un acide aminé variable (Pullikotil et al., 2004). Bien que ces convertases partagent des similarités structurales avec les autres membres de la famille des PC, elles



se distinguent par leur spécificité de clivage. Les convertases SKI-1/S1P et NARC-1 ne feront donc pas l'objet de discussions plus approfondies dans cette thèse.

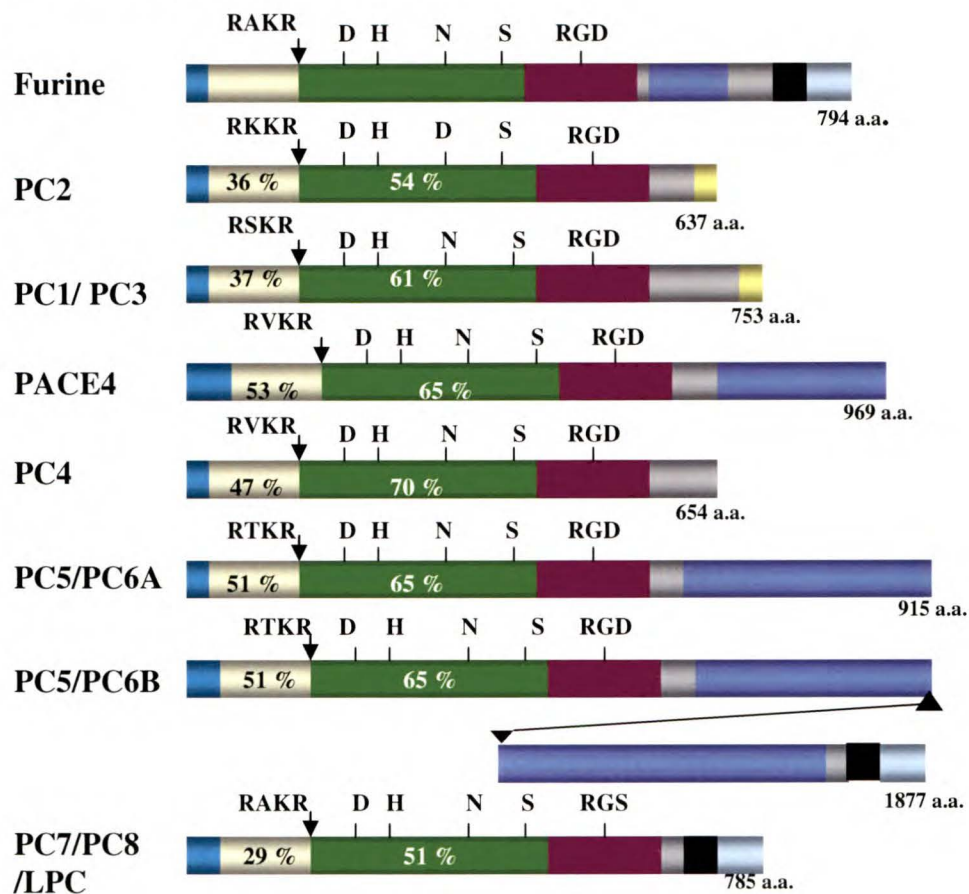
## **1.2. La structure des convertases de proprotéines.**

Les convertases de proprotéines partagent plusieurs motifs structuraux distincts relativement conservés, tel qu'un peptide signal, une pro-région, un domaine catalytique et un domaine P (figure 1). Le peptide signal, situé à l'extrémité N-terminale, est nécessaire à l'entrée de l'enzyme dans la voie de sécrétion de la cellule. Les convertases, initialement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, sont également caractérisées par la présence d'une pro-région constituée de 80 à 90 acides aminés. Ce pro-domaine est clivé par autocatalyse, ce qui permet le relâchement des enzymes biologiquement actives (Creemers et al., 1993; Goodman and Gorman, 1994; Leduc et al., 1992; Matthews et al., 1994). Il est intéressant de souligner que suite à son clivage, le pro-domaine demeure associé au site catalytique de la convertase lors de son transport intra-cellulaire et agit en tant qu'inhibiteur compétitif afin de préserver l'activité de l'enzyme (Fu et al., 2000). Le mécanisme d'activation de la furine est illustré à la figure 2 (Anderson et al., 2002; Anderson et al., 1997; Thomas, 2002).

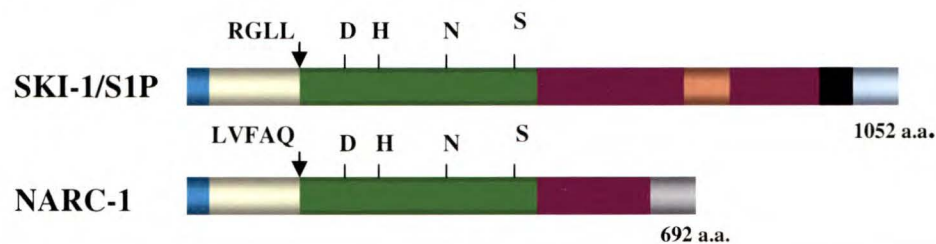
Le domaine catalytique est celui qui présente la plus grande homologie de séquence entre les diverses PC. On y retrouve entre autres les résidus Asp, His, Ser ainsi qu'un résidu Asn (Asp pour la PC2) qui sont des caractéristiques des protéases de type sérine (Bryan et al., 1986). Le domaine P, situé du côté C-terminal de la région catalytique de toutes les

**Figure 1: Représentation schématique des diverses convertases de proprotéines de mammifères.** Les PC de mammifères sont divisées en deux grandes catégories en fonction de leur préférence catalytique pour des motifs dibasiques ou non-basiques. Les différents domaines constituant chacune des PC sont représentés. On retrouve la triade d'acides aminés caractéristique des protéases de type sérine : Asp (D), His (H) et Ser (S) ainsi que le résidu Asn (N) (Asp (D) dans le cas de la PC2) qui interagit avec le substrat dans la poche catalytique. Les convertases reconnaissant un motif dibasique sont caractérisées par la présence d'un motif RGD (Arg-Gly-Asp) ou RGS (Arg-Gly-Ser) dans le cas de la PC-7. Les pourcentages d'homologie du domaine catalytique et de la pro-région de chacune des convertases par rapport à la furine, le prototype de la famille, sont indiqués. Il est à noter que la PC5/PC6A et la PC5/PC6B sont des isoformes de la même convertase.

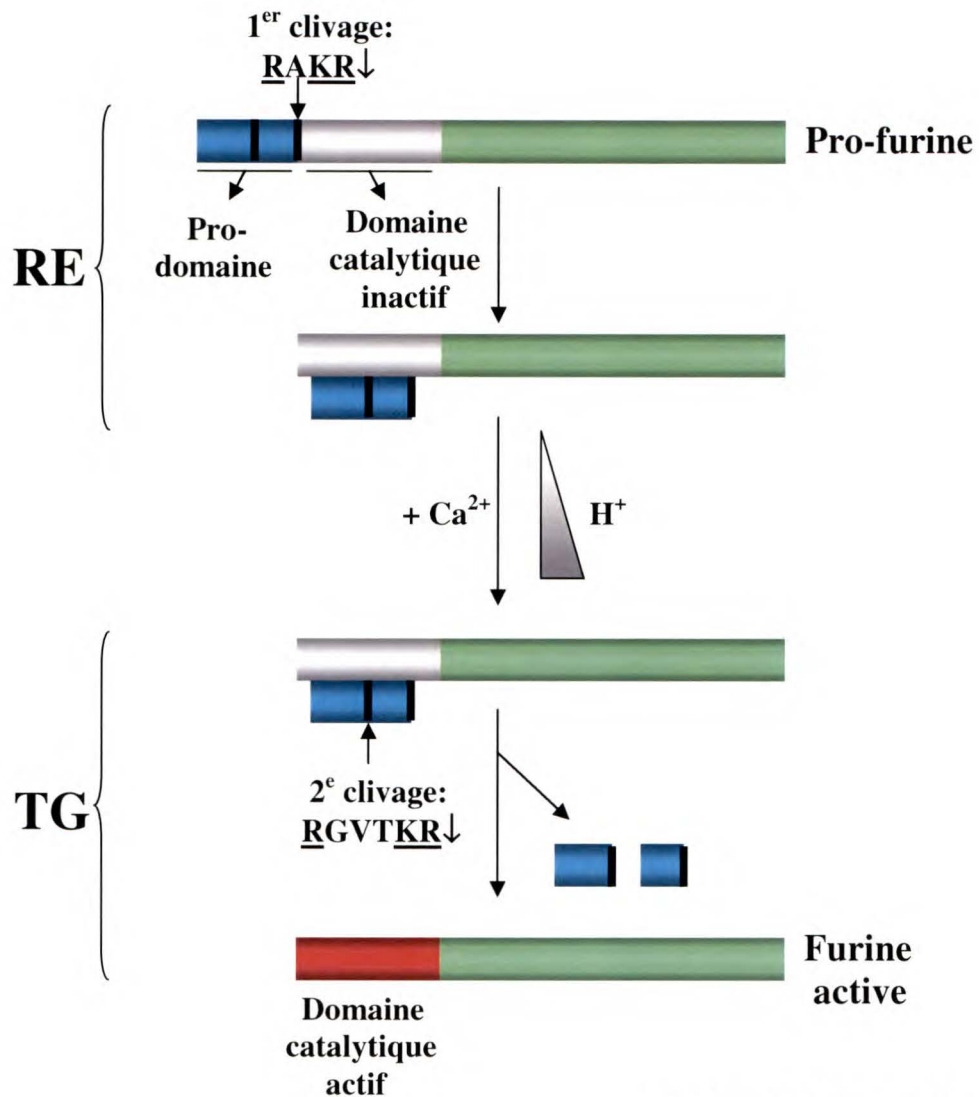
## Motifs dibasiques:



## Motifs non-basiques:



Adapté de Nakayama *et al.*, 1997

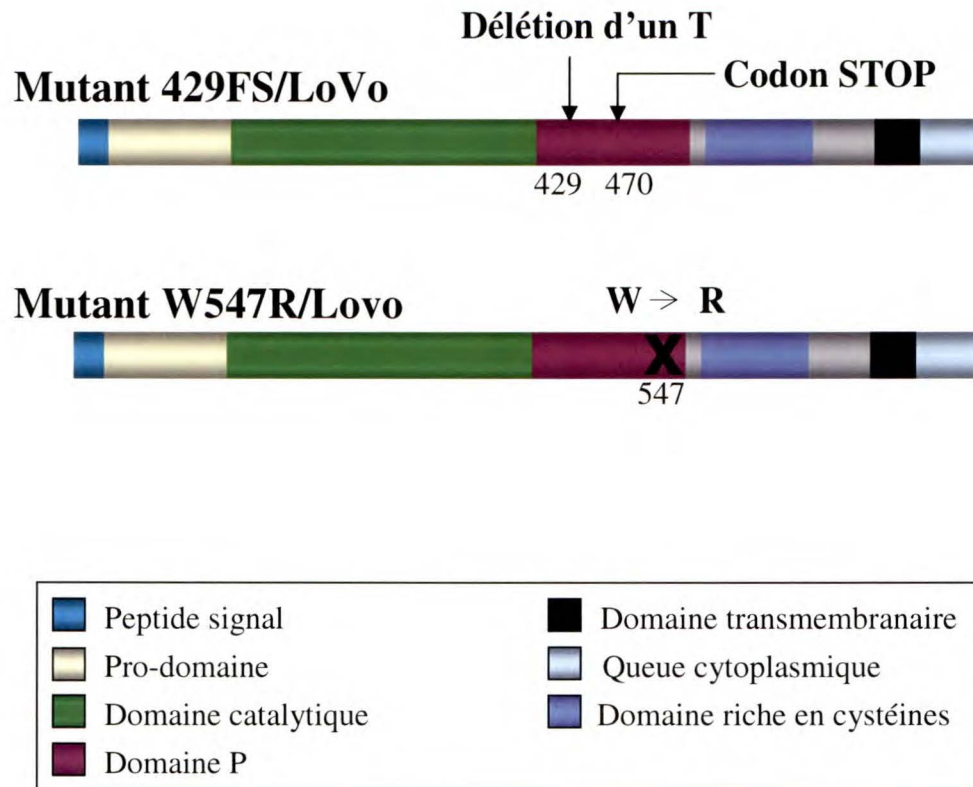


Adapté de Molloy *et al.*, 1999

**Figure 2: La voie d'activation de la furine.** La furine est synthétisée initialement sous la forme d'un zymogène. Dans le réticulum endoplasmique (RE), en condition de pH neutre, la pro-région de la furine est excisée par un clivage autocatalytique au site Arg-Thr-Lys-Arg↓. Le pro-domaine demeure associé à l'enzyme et agit en tant qu'auto-inhibiteur. Dans l'environnement acide du *trans*-Golgi (TG), le pro-domaine de la furine subit un second clivage autocatalytique suivant le motif Arg-Gly-Val-Thr-Lys-Arg↓. Ce clivage libère les pro-fragments, ce qui induit l'activation de la furine.

PC, est essentiel à l'activité et la cohésion structurale des enzymes (Hatsuzawa et al., 1992a; Henrich et al., 2003; Takahashi et al., 1993; Ueda et al., 2003). L'importance de ce domaine dans le maintien de l'activité enzymatique de la furine est démontrée chez les cellules LoVo, une lignée cellulaire d'adénocarcinome de colon humain (Takahashi et al., 1993; Takahashi et al., 1995). Chez ces cellules, une mutation ponctuelle est observée dans chacun des allèles encodant le domaine P de la furine, ce qui cause une inhibition complète de l'activité de cette convertase (figure 3). On observe également à l'intérieur du domaine P la présence d'un motif RGD conservé (RGS dans le cas de la PC7). Ce domaine, caractéristique aux intégrines, semble important pour l'adressage des convertases vers la voie de sécrétion constitutive ou régulée, tel que démontré pour la PC1 (Lusson et al., 1997; Rovere et al., 1999).

La séquence C-terminale située en aval du domaine P diffère grandement entre les différents membres de la famille des PC. D'abord, des isoformes dont le domaine C-terminal varie selon l'épissage alternatif, sont observées chez les convertases PC4, PC5 et PACE4 (Kiefer et al., 1991; Nakagawa et al., 1993b; Seidah et al., 1992; Tsuji et al., 1994; Zhong et al., 1996). Également, certaines PC, dont la furine, l'isoforme PC5B et la PC7, contiennent une région transmembranaire (Bruzzaniti et al., 1996; Hatsuzawa et al., 1992a; Nakagawa et al., 1993b). Ce domaine sert de point d'ancrage à la furine qui réside principalement dans le *trans*-Golgi et lui permet de circuler à la membrane cellulaire via les endosomes (Bosshart et al., 1994; Chapman and Munro, 1994; Molloy et al., 1994). Un domaine riche en cystéine de fonction encore inconnue est retrouvé chez les



**Figure 3: Représentation des mutations contenues dans chacun des allèles encodant la furine chez les cellules LoVo.** Les cellules d'adénocarcinome de colon humain de type LoVo produisent de la furine inactive. Chacun des allèles encodant la furine contient une mutation ponctuelle dans le domaine P. La première mutation à avoir été découverte est la délétion d'un résidu thréonine en position 429 qui introduit un codon stop en position 470 et donne lieu à la production d'une protéine tronquée. La seconde mutation à avoir été identifiée consiste en un remplacement, en position 547, d'un résidu tryptophane pour un arginine. La combinaison de ces deux mutations entraîne une absence d'activité protéolytique de la furine chez les cellules LoVo.

convertases furine, PACE4 et les deux isoformes de PC5 (Lusson et al., 1993; Nakagawa et al., 1993b; Roebroek et al., 1992).

### **1.3 La localisation cellulaire et tissulaire des PC.**

L'une des caractéristiques communes aux convertases de proprotéines est leur capacité à cliver des substrats du côté C-terminal d'une paire d'acides aminés basiques, ce qui soulève la possibilité de redondance dans leurs activités biologiques. Il est connu qu'une cellule peut exprimer plus d'une convertase à la fois (Mori et al., 1999; Seidah et al., 1994). Cependant, puisque la localisation intra-cellulaire et tissulaire de chacune des PC diverge, on leur suggère un rôle particulier dans les événements de maturation de précurseurs protéiques. À la lumière des résultats obtenus par immunohistochimie et buvardages de type Northern, on peut subdiviser les membres de la famille des PC en quatre groupes selon leur distribution intra-cellulaire et tissulaire (Seidah et al., 1998).

La première classe est composée de la furine et de la PC7. La furine est principalement localisée dans le *trans*-Golgi et peut circuler à la membrane plasmique via les endosomes (Shapiro et al., 1997). Une localisation similaire dans la voie de sécrétion constitutive est proposée pour la convertase PC7 (Munzer et al., 1997). Ces convertases présentent une distribution très large, dite ubiquiste, mais à des niveaux d'expression variables selon les tissus (Seidah et al., 1994; Seidah et al., 1998; Seidah et al., 1996). Dans le deuxième groupe, on retrouve les convertases PC1 et PC2 dont l'expression est limitée aux tissus endocriniens et neuroendocriniens tels que les îlots pancréatiques, les glandes surrénales ainsi que plusieurs structures du cerveau (Rouille et al., 1995; Seidah et al., 1994; Seidah

et al., 1991). Ces convertases sont responsables de la maturation des pro-hormones et des pro-neuropeptides de la voie de sécrétion régulée et résident principalement dans les granules de sécrétion denses (Malide et al., 1995; Rouille et al., 1995). Les convertases de la troisième classe, soit la PACE4 et les deux isoformes de la PC5 (PC5A et PC5B), sont exprimées dans les tissus endocriniens et non-endocriniens (Zheng et al., 1997). Des analyses par microscopie électronique ont révélé la présence de la PC5A dans les granules denses de la voie de sécrétion régulée tandis que l'isoforme PC5B se situe plutôt au niveau du *trans*-Golgi (De Bie et al., 1996). En ce qui concerne la localisation intracellulaire de la PACE4, peu de choses sont connues à l'exception de sa capacité à cliver des substrats de la voie de sécrétion constitutive (Mains et al., 1997). Finalement, la PC4 compose la dernière classe et se distingue par son expression restreinte aux cellules germinales testiculaires et aux cellules ovariennes de type macrophage (Seidah et al., 1992; Tadros et al., 2001).

Tel que résumé au tableau I, les convertases PC1, PC2 et PC5A se retrouvent principalement dans les granules de la voie de sécrétion régulée, tandis que la furine, la PC5B et la PC7 réside au *trans*-Golgi. La localisation des ces dernières serait dépendante de leur queue cytoplasmique qui leur permet également de circuler jusqu'à la membrane plasmique via les endosomes (Molloy et al., 1999; Molloy et al., 1998; Molloy et al., 1994). La localisation intracellulaire exacte de la PACE4 et de la PC4 demeure toutefois inconnue.



**Tableau I : Localisation cellulaire et tissulaire des convertases de proprotéines**

Convertases de proprotéines	Localisation cellulaire	Expression tissulaire
<b>Classe I</b>		
Furine	<i>Trans</i> -Golgi, endosomes, surface cellulaire	Ubiquiste
PC7	<i>Trans</i> -Golgi, endosomes, surface cellulaire	Ubiquiste
<b>Classe II</b>		
PC1	<i>Trans</i> -Golgi et granules de sécrétion	Cellules neuroendocrines
PC2	Granules de sécrétion	Cellules neuroendocrines
<b>Classe III</b>		
PACE4	<i>Trans</i> -Golgi, ? granules de sécrétion	Distribution Large
PC5A	<i>Trans</i> -Golgi, granules de sécrétion	Distribution Large
PC5B	<i>Trans</i> -Golgi, endosomes, surface cellulaire	Restreinte (système digestif et cortex adrénal)
<b>Classe IV</b>		
PC4	? <i>Trans</i> -Golgi, ? granules de sécrétion, ? surface cellulaire	Restreinte (cellules testiculaires et ovariennes)

Adapté de Seidah *et al.*, 1999

#### 1.4 La spécificité de maturation des substrats.

Des sites de reconnaissance spécifiques aux convertases de proprotéines sont retrouvés chez une grande variété de précurseurs protéiques des voies de sécrétion constitutive et régulée (Khatib et al., 2002; Molloy et al., 1999; Nakayama, 1997; Seidah et al., 1998). Tel que présenté au tableau II, ces précurseurs incluent, entre autres, des facteurs de croissance, des récepteurs cellulaires, des hormones, des neuropeptides, des protéines pathogènes, des protéines de la matrice extracellulaire ainsi que des protéines sériques. Ceci suggère un rôle pour les PC dans diverses conditions physiologiques et pathologiques (discuté plus loin). Ainsi, à la suite de la découverte des PC, l'un des objectifs majeurs a été d'identifier les relations enzyme/substrats afin d'expliquer l'existence de cette famille de protéases relativement grande, dont plusieurs membres peuvent être exprimés simultanément dans les cellules. Des expériences de coexpression de chacune des convertases en présence de proprotéines de type sauvage ou modifiées par mutagenèse dirigée ont permis de démontrer que ces enzymes sont capables de cliver des substrats suivant des résidus monobasiques, dibasiques ou multibasiques selon la séquence consensus (K/R)-X<sub>n</sub>-(K/R)↓ dans laquelle n=0, 2, 4 ou 6 et X représente n'importe quel acide aminé, sauf Cys (Dupuy et al., 1994; Hatsuzawa et al., 1992a; Oda et al., 1991; Seidah et al., 1994). Selon les résultats obtenus en conditions *in vitro*, plus d'une convertase possède la capacité de cliver un même substrat, ce qui suggère de la redondance dans leurs activités. Toutefois, de façon endogène, une certaine spécificité semble prévaloir et on peut ainsi classer les précurseurs protéiques en 4 catégories (voir le tableau II) (Seidah et al., 1998).

**Tableau II : Classification fonctionnelle de précurseurs clivés par les convertases de proprotéines.**

Précurseur	site de clivage							catégorie	
	P6	P5	P4	P3	P2	P1 ↓	P1'	P2'	
<b>Convertases</b>									
Pro-furine	Lys	Arg	Arg	Thr	Lys	Arg	Asp	Val	I
Pro-PC1	Lys	Glu	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Ala	I
Pro-PC2	Phe	Asp	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Tyr	I
Pro-PACE	Lys	Arg	Arg	Val	Lys	Arg	Gln	Val	I
Pro-PC4	Arg	Arg	Arg	Val	Lys	Arg	Ser	Leu	I
Pro-PC5	Lys	Lys	Arg	Thr	Lys	Arg	Asp	Tyr	I
Pro-PC7	Leu	Arg	Arg	Ala	Lys	Arg	Ser	Val	I
<b>Facteurs de croissance</b>									
Pro-NGF	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Ser	I
Pro-BDNF	Ser	Met	Arg	Val	Arg	Arg	His	Ser	I
Pro-PDGF-A	Pro	Ile	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser	Ile	I
Pro-PDGF-B	Leu	Ala	Arg	Gly	Arg	Arg	Ser	Leu	I
Pro-TGFβ1	Ser	Ser	Arg	His	Arg	Arg	Ala	Leu	I
Pro-IGF-I	Pro	Ala	Lys	Ser	Glu	Arg	Asp	Val	III
Pro-IGF-II	Phe	Arg	Glu	Ala	Lys	Arg	His	Arg	IV
Pro-VEGF-C	His	Ser	Ile	Ile	Arg	Arg	Ser	Leu	II
<b>Récepteurs</b>									
Pro-récepteur à insuline	Pro	Ser	Arg	Lys	Arg	Arg	Ser	Leu	I
Pro-récepteur à IGF-I	Pro	Glu	Arg	Lys	Arg	Arg	Asp	Val	I
Pro-récepteur de Notch1	Gly	Gly	Arg	Gln	Arg	Arg	Glu	Leu	I
Intégrine α3	Pro	Gln	Arg	Lys	Arg	Arg	Gln	Leu	I
Intégrine αv	His	Leu	Ile	Thr	Lys	Arg	Asp	Leu	II
Récepteur du HGF	Glu	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Ser	Thr	I
E-cadhérine	Leu	Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Asp	Trp	I
VE-cadhérine	His	Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Asp	Trp	I
<b>Protéines pathogènes</b>									
gp 160 de HIV-1	Val	Gln	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Val	I
HA de l'influenza aviaire	Lys	Lys	Arg	Glu	Lys	Arg	Gly	Leu	I
Gp du virus Ebola	Gly	Arg	Arg	Thr	Arg	Arg	Glu	Ala	I
GB du cytomégalo­virus	Thr	His	Arg	Thr	Arg	Arg	Ser	Thr	I
GB du virus Epstein-Barr	Leu	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Asp	Ala	I
Virus M de la fièvre jaune	Ser	Gly	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Val	I
PA de <i>B. anthracis</i>	Asn	Ser	Arg	Lys	Lys	Arg	Ser	Thr	I
Toxine de <i>Diphtérie</i>	Gly	Asn	Arg	Val	Arg	Arg	Ser	Val	I
Pro-aérolysine	Lys	Ala	Ala	Gln	Leu	Arg	Ser	Ala	III
Exotoxine A de <i>pseudomonas</i>	Arg	His	Arg	Gln	Pro	Arg	Gly	Trp	III

Précurseur	site de clivage							catégorie	
	P6	P5	P4	P3	P2	P1 ↓	P1' P2'		
<b>Hormones/neuropeptides</b>									
<b>POMC</b>									
(JP/ACTH)	Pro	Arg	Glu	Gly	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Ser Tyr	II	
(ACTH/βLPH)	Pro	Leu	Glu	Phe	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Glu Leu	II	
(αMSH/CLIP)	Pro	Val	Gly	Lys	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Arg Pro	II	
<b>Pro-insuline</b>									
(chaîne B/C)	Thr	Pro	<b>Lys</b>	Thr	<b>Arg</b>	<b>Arg</b>	Glu Ala	II	
(chaîne C/A)	Gly	Ser	Leu	Gln	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Gly Ile	II	
<b>Pro-dynorphine</b>									
	<b>Arg</b>	Lys	Gln	Ala	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Tyr Gly	II	
	Glu	Asp	Leu	Tyr	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Tyr Gly	II	
<b>Pro-nociceptine</b>									
	Lys	Gln	Leu	Gln	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Met Pro	II	
	Leu	Ala	Asn	Gln	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Phe Ser	II	
Pro-7B2	Glu	Arg	<b>Arg</b>	Lys	<b>Arg</b>	<b>Arg</b>	Ser Val	I	
Pro-glucagon	Leu	Met	Asn	Thr	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	His <b>Arg</b>	IV	
<b>Protéines de la matrice extracellulaire</b>									
Pro-BMP-1	<b>Arg</b>	Ser	<b>Arg</b>	Ser	<b>Arg</b>	<b>Arg</b>	Ala Ala	I	
Pro-fibrilline	<b>Arg</b>	Gly	<b>Arg</b>	Lys	<b>Arg</b>	<b>Arg</b>	Ser Thr	I	
Pro-stromélysine	<b>Arg</b>	Asn	<b>Arg</b>	Gln	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Phe Val	I	
Pro-ADAM-17 (TACE)	Val	His	<b>Arg</b>	Val	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Arg Ala	I	
Pro-aggrécanase	<b>Arg</b>	Pro	<b>Arg</b>	Ala	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Phe Ala	I	
Pro-MT1-MMP	Asn	Val	<b>Arg</b>	Arg	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Tyr Ala	I	
<b>Protéines sériques</b>									
Pro-albumine	<b>Arg</b>	Gly	Val	Phe	<b>Arg</b>	<b>Arg</b>	Asp Ala	II	
Pro-facteur IX	Leu	Asn	<b>Arg</b>	Pro	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Tyr Asn	I	
Pro-protéine C	<b>Arg</b>	Ser	His	Leu	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Asp Thr	II	
Pro-facteur von Willebrand	Ser	His	<b>Arg</b>	Ser	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Ser Leu	I	
Pro-endothéline	Ile	Arg	<b>Arg</b>	Ser	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Cys Ser	I	

Adapté de Seidah *et al.*, 1999

Les précurseurs sont divisés en quatre catégories en fonction de leur motif de reconnaissance par les convertases de proprotéines constitué de résidus basiques essentiels en position P1, P2, P4, P6 et/ou P2' (identifiés en caractère gras). Cette liste, non-exhaustive, inclue une grande variété de substrats impliqués dans différents processus physiologiques et pathologiques.

Les précurseurs de type I consistent en des proprotéines de la voie de sécrétion constitutive qui présentent un site de clivage correspondant à R-X-R/K-R↓, un motif privilégié par la furine (Hatsuzawa et al., 1992a; Hosaka et al., 1991). Puisque la furine et la PC7 sont largement exprimées dans différents tissus et types cellulaires et résident principalement dans le *trans*-Golgi, les précurseurs présentant ce motif sont préférentiellement clivés par ces enzymes. Les précurseurs de type II sont clivés en C-terminal d'une paire d'acides aminés basiques de type (R/K)-(K/R)↓. Un acide aminé basique (R, K ou H) peut être retrouvé de 4 à 6 résidus en N-terminal du site de clivage. Ces précurseurs incluent, de façon majoritaire, les hormones et neuropeptides synthétisés sous forme de pro-peptides qui sont généralement clivés par les convertases PC1 et PC2 à l'intérieur des granules de sécrétion (Benjannet et al., 1991; Malide et al., 1995; Rouille et al., 1995; Smeeckens et al., 1992). Les précurseurs de type III sont clivés suivant un site monobasique généralement constitué d'un R↓ précédé d'un résidu basique en position P4, P6 ou P8 (Devi, 1991). Bien que le motif R-X-X-R représente la séquence consensus minimale reconnue par la furine (Hatsuzawa et al., 1992b; Molloy et al., 1992; Nakayama, 1997), aucune convertase ne semble présenter de spécificité particulière pour ce type de précurseurs. La quatrième catégorie de précurseurs contient les proprotéines dont la maturation a lieu à la suite d'un site mono ou dibasique. Ces protéines diffèrent de celles des autres groupes par la présence caractéristique d'un R ou K situé en position P2', soit à deux bases en aval du site de clivage. La convertase PC5A semble être la plus apte à cliver ce type de précurseurs (Campan et al., 1996; Nachtigal and Ingraham, 1996).

Le domaine catalytique de chacune des PC est responsable de leur capacité à cliver des substrats et définit leurs préférences catalytiques. La spécificité d'action des convertases dépend également de la régulation de leur expression au niveau intra-cellulaire et tissulaire ainsi que de leur colocalisation avec des substrats. Bien qu'on ait démontré qu'un même précurseur peut être clivé par différentes convertases *in vitro*, il est possible que dans un contexte *in vivo*, selon le répertoire de PC exprimées par les cellules, les proprotéines ne rencontrent qu'une enzyme apte à les cliver. Également, les études de surexpression sont susceptibles de fournir de faux résultats positifs étant donné la présence d'enzymes à des niveaux non-physiologiques et ce, dans un contexte souvent hétérologue.

L'étude des patrons d'expression tissulaire révèle que chaque PC pourrait participer à des fonctions biologiques différentes puisqu'aucune convertase ne présente une distribution identique (Beaubien et al., 1995; Day et al., 1993; Day et al., 1992; Dong et al., 1995; Dong et al., 1997; Schafer et al., 1993; Seidah et al., 1994). Des évidences plus directes sur le rôle de chacune des PC en contexte physiologique ont été obtenues de modèles de souris transgéniques déficientes pour les différentes convertases. D'abord, la furine, dont les fonctions biologiques sont les mieux définies, ne semble pas essentielle à la survie de lignées cellulaires déjà établies, puisque l'absence de furine fonctionnelle chez les cellules LoVo (Takahashi et al., 1993; Takahashi et al., 1995) et CHO RPE.40 (Inocencio et al., 1993; Inocencio et al., 1997) n'est pas létale. On suppose que la survie des cellules LoVo est due à l'expression d'autres PC telles que la PACE4 et la PC7 (Hallenberger et al., 1997; Miranda et al., 1996; Seidah et al., 1994). Récemment, l'équipe du Dr Creemers a développé un modèle de souris transgéniques présentant une déficience de l'expression de

la furine au foie qui est conditionnelle à la réponse à l'interféron (*interferon inducible Mx-Cre/loxP furin knock-out mouse model*) (Roebroek et al., 2004). Malgré l'inactivation presque complète de la furine dans le foie de souris adultes, aucune anormalité morphologique n'a été observée. De plus, la maturation de divers substrats de la furine était soit non affectée (le récepteur de l'insuline) ou altérée sans être complètement bloquée (l'intégrine  $\alpha 5$ , le récepteur protéique lié à la lipoprotéine, l'albumine et la vitronectine). Ces résultats sont en contradiction avec la mort embryonnaire de souris arborant une déficience générale en furine, indiquant une fonction non redondante lors des étapes précoces du développement (Constam and Robertson, 2000b; Roebroek et al., 1998). Le patron d'expression de la furine lors de l'embryogenèse diffère nettement de celui des convertases PC1, PC2, PACE4 et PC5 (Marcinkiewicz et al., 1993; Marcinkiewicz et al., 1994; Zheng et al., 1997). On lui suggère un rôle essentiel dans la maturation de facteurs de croissance nécessaires au développement puisque les embryons *fur*  $-/-$  présentent des défauts de croissance dès le 8<sup>e</sup> jour embryonnaire et meurent entre le 11<sup>e</sup> et 12<sup>e</sup> jour (Roebroek et al., 1998).

Des modèles de souris déficientes pour les autres PC, à l'exception de la PC5A, ont été réalisés et les phénotypes observés sont résumés au tableau III. Brièvement, l'inactivation de la PC5B est létale au stade embryonnaire (Taylor et al., 2003) tandis qu'une fraction des souris déficientes pour la PC1 (Villeneuve et al., 2002; Zhu et al., 2002) et la PACE4 (Constam and Robertson, 2000a) meurent *in utero*. Une déficience de la convertase PC2 donne lieu à des phénotypes sévères mais viables (Furuta et al., 1997). Les animaux

**Tableau III:** Les phénotypes associés à la déficience en convertases de proprotéines chez la souris.

Convertase de proprotéines déficiente	Phénotypes	Références
<b>Furine</b>	Mort embryonnaire Défauts dans la fermeture ventrale Insuffisance hémodynamique Absence de rotation axiale	Roebroek <i>et al.</i> , 1998 Constam <i>et al.</i> , 2000
<b>PC1/PC3</b> (modèle A)	Mort embryonnaire (40%) Mort post-partum (40%)  20% de souriceaux survivants : nanisme et diarrhée chronique	Zhu <i>et al.</i> , 2002
<b>PC1/PC3</b> (modèle B)	Mort embryonnaire	Villeneuve <i>et al.</i> , 2002
<b>PC2</b>	Retard de croissance post-partum Hypoglycémie Défauts de maturation de peptides endocriniens	Furuta <i>et al.</i> , 1997
<b>PC4</b>	Réduction de la fertilité	Mbikay <i>et al.</i> , 1997
<b>PACE4</b>	Phénotypes variables : 25% de mort embryonnaire Malformations cardiaques Défauts dans la rotation axiale Défauts cranofaciaux	Constam <i>et al.</i> , 2000
<b>PC5A</b>	Aucun modèle disponible	
<b>PC5B</b>	Mort embryonnaire (e10.5-11.5)	Taylor <i>et al.</i> , 2003
<b>PC7</b>	Aucun phénotype rapporté	Taylor <i>et al.</i> , 2003



déficients en PC4 sont également viables mais ont une fertilité réduite (Mbikay et al., 1997b). Seules les souris déficientes pour la convertase largement exprimée PC7 ne présentent pas de phénotypes particuliers, ce qui suggère une redondance complète (Taylor et al., 2003). Ces études indiquent donc que l'activité de certaines PCs est non-redondante, en ce qui concerne la maturation de protéines essentielles au développement embryonnaire, et laissent présager des fonctions redondantes pour d'autres convertases.

### **1.5 Les inhibiteurs des convertases de proprotéines.**

Les convertases de proprotéines constituent une cible d'intérêt pour le développement d'inhibiteurs spécifiques puisqu'elles sont responsables de l'activation d'une panoplie de protéines impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (discuté plus loin). Le développement d'inhibiteurs représente également un outil d'intérêt afin de délimiter les fonctions et les substrats spécifiques à chacune des convertases. Au fil des années, différents inhibiteurs ont été caractérisés. Parmi les plus communs, on retrouve des inhibiteurs synthétisés chimiquement, des inhibiteurs protéiques modifiés possédant un motif de reconnaissance pour la furine ainsi que des inhibiteurs exprimés de façon endogène.

Parmi les inhibiteurs chimiques, on retrouve le décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CH<sub>2</sub>Cl. Cet inhibiteur compétitif, capable de former un complexe enzyme-inhibiteur covalent, consiste en une séquence peptidique représentant le motif de reconnaissance pour la furine couplée à un chlorométhylketone (Angliker, 1995; Basak et al., 1995; Garten et al., 1994; Jean et al., 1995). Bien que relativement puissant, des études d'activités enzymatiques ont établi que cet inhibiteur n'est pas spécifique à la furine puisqu'il inhibe les six autres

membres de la famille des PC avec une efficacité similaire (tableau IV) (Jean et al., 1998). Un second inhibiteur synthétisé chimiquement est le nona-L-arginine qui est, comme son nom l'indique, un peptide formé de 9 L-arginines (Cameron et al., 2000a). Ce peptide présente une certaine spécificité pour la furine avec un  $K_i$  de 40 nM, mais peut tout de même inhiber la PACE4 et la PC1 avec des valeurs respectives de  $K_i$  de 110 nM et 2,5  $\mu$ M.

Une deuxième forme de molécules inhibitrices est issue d'inhibiteurs protéiques modifiés afin d'introduire un site de reconnaissance pour la furine. Parmi ceux-ci, il a été démontré que l'inhibiteur général de protéases  $\alpha_2$ -macroglobuline ( $\alpha_2$ M), muté de façon à exprimer un motif de reconnaissance furine, se complexe avec la furine et inhibe son action *in vitro* et *in vivo* (Van Rompaey et al., 1997). Cependant, malgré la présence d'un motif de type furine, l' $\alpha_2$ M mutée n'est pas spécifique pour les PC puisqu'elle est capable d'inhiber aussi efficacement d'autres protéases telles que la trypsine et l'élastase. Une seconde approche utilisée dans le développement d'inhibiteurs protéiques pour les PC a consisté en la construction d'une version modifiée de la serpine (*serine protease inhibitor*)  $\alpha_1$ -antitrypsine ( $\alpha_1$ -AT) (Anderson et al., 1993; Benjannet et al., 1997; Jean et al., 1998). L' $\alpha_1$ -AT humaine est un inhibiteur physiologique de l'élastase de neutrophiles (Kurachi et al., 1981; Perlmutter and Pierce, 1989). Le remplacement de la méthionine en position 358 par une arginine (AIPM à AIPR) dans le site catalytique de l' $\alpha_1$ -AT modifie la spécificité de la serpine de l'élastase à la thrombine (Owen et al., 1983). Ce mutant nommé  $\alpha_1$ -AT Pittsburgh a été identifié chez des patients souffrant d'hémophilie pour

**Tableau IV :** Efficacité du peptide Dec-RVKR-CH<sub>2</sub>Cl à inhiber *in vitro* l'activité enzymatique des convertases de proprotéines de mammifère.

Convertases	Inhibiteur Dec- <u>Arg</u> -Val- <u>Lys</u> - <u>Arg</u> -CH <sub>2</sub> Cl K <sub>i</sub> (nM)
<b>Furine</b>	<b>0.6</b>
<b>PC1/PC3</b>	<b>2.0</b>
<b>PC2</b>	<b>0.36</b>
<b>PACE4</b>	<b>3.6</b>
<b>PC5/PC6</b>	<b>0.11</b>
<b>PC7</b>	<b>0.12</b>

Adapté de Jean *et al.*, 1998

**Tableau V :** Efficacité de la serpine modifiée  $\alpha$ 1-antitrypsine PDX à inhiber *in vitro* l'activité enzymatique des convertases de proprotéines de mammifère.

Convertases	$\alpha$ 1-AT-PDX K <sub>i</sub> (nM)
Furine	0.6
PC5/PC6	2.3
PC1/PC3	260
PC2	1000
PACE4	>5000
PC7	>5000
Thrombine	>5000

Adapté de Jean *et al.*, 1998

lesquels une déficience sévère dans l'activité de la thrombine a été observée. Par la suite, le groupe de recherche du Dr Thomas a muté l'alanine en P4 pour une arginine afin d'obtenir un motif de reconnaissance pour la furine (**RIPR**) générant ainsi l' $\alpha$ 1-AT Portland ( $\alpha$ 1-PDX) (Anderson et al., 1993). Cet inhibiteur forme un complexe stable avec la furine et agit en tant que substrat suicide (Jean et al., 1998). Des essais enzymatiques indiquent que l' $\alpha$ 1-PDX est un inhibiteur puissant et spécifique de la furine avec un  $K_i$  de 0,6 nM. Il peut aussi inhiber la convertase PC5, toutefois à un niveau moindre ( $K_i$  de 2,3 nM). Des doses de 100 à 2000 fois plus élevées sont nécessaires afin d'inhiber les autres membres de la famille des PC ainsi que la protéase thrombine (tableau V) (Anderson et al., 1993; Jean et al., 1998).

Viennent ensuite les inhibiteurs endogènes des convertases. Lors des études de caractérisation du PI8 (*proteinase inhibitor 8*), il a été établi que cette serpine présentait la capacité d'inhiber des protéases humaines, soit la trypsine et la thrombine, ainsi que la subtilisine A de *Bacillus subtilis* (Dahlen et al., 1997; Sprecher et al., 1995). Cette serpine, de la famille de l'ovalbumine, contient en son site actif deux motifs de reconnaissance pour la furine et forme un complexe SDS-stable avec la furine, ce qui engendre une inhibition de son activité avec un  $K_i$  de 54 pM (Dahlen et al., 1998). Il a été démontré au laboratoire que le PI8 inhibe efficacement la furine des plaquettes. Toutefois, cet inhibiteur ne représente pas un outil de travail spécifique puisqu'il peut inhiber des protéases autres que les PC, tel que mentionné précédemment, et que son aptitude à inhiber d'autres membres de la famille des PC n'a pas encore été étudiée. Une nouvelle serpine, nommée Spn4A, a récemment été identifiée chez la *Drosophila* (Oley et al.,

2004; Richer et al., 2004). Le Spn4A présente un motif de reconnaissance furine (R-R-K-R↓) et est impliqué dans le processus de maturation de peptides dans la voie de sécrétion endogène de la Drosophile. Le Spn4A inhibe la furine humaine et la PC2 de drosophile avec des *Ki* respectifs de 13 pM et de 3.5 nM, ce qui en fait l'inhibiteur de la furine le plus puissant parmi les molécules caractérisées jusqu'à maintenant (Richer et al., 2004). Des études supplémentaires sont toutefois requises afin de déterminer sa spécificité face aux autres membres de la famille des PC. Des inhibiteurs endogènes de la PC1 et de la PC2 ont également été identifiés. La protéine 7B2, le premier inhibiteur endogène des convertases à avoir été découvert, inhibe la PC2 lorsque utilisée à des concentrations de l'ordre des nanomolaires (Lindberg et al., 1995; Muller and Lindberg, 1999) tandis des concentrations de l'ordre des micromolaires de proSAAS inhibe la PC1 (Fricker et al., 2000). L'activité inhibitrice de la 7B2 est hautement spécifique pour la PC2 (Lindberg et al., 1995) tandis que le proSAAS peut inhiber la PC1, la PC2 ainsi que la furine (Cameron et al., 2000b).

Tel que mentionné précédemment, les convertases de proprotéines contiennent un pro-segment, qui une fois clivé, joue le rôle d'inhibiteur endogène « en *cis* » afin de préserver l'activité de l'enzyme lors de son transport dans la cellule (Fu et al., 2000). Puisque les pro-segments de chacune des PC ne présentent que de faibles niveaux d'homologie (voir figure 1), il a été suggéré que ces pro-domaines puissent être utilisés en tant qu'inhibiteurs puissants et spécifiques pour leur enzyme respective. Plusieurs équipes de recherche ont étudié la spécificité et la capacité d'inhibition des pro-domaines de chacune des convertases sur des préparations d'enzymes purifiées (Boudreault et al., 1998; Fugere et al., 2002; Zhong et al., 1999b). Les résultats révèlent que les pro-segments sont des

inhibiteurs puissants des PC (de l'ordre du nanomolaire). Toutefois, les pro-domaines ne sont pas hautement spécifiques pour leur enzyme parentale et donc des modifications structurales seraient nécessaires afin d'augmenter les niveaux de spécificité en vue d'une utilisation en tant qu'inhibiteurs spécifiques.

Ainsi, malgré les nombreuses tentatives, le développement d'inhibiteurs sélectifs pour chacune des convertases demeure problématique et ce, probablement à cause des similarités observées au niveau des domaines catalytiques et de la spécificité de clivage apparente des PC.

## **1.6 L'implication de la furine dans les processus physiologiques et pathologiques.**

L'activation spatio-temporelle appropriée de proprotéines est manifestement importante pour le maintien de l'homéostasie. Cependant, des pathogènes bactériens et viraux peuvent utiliser la machinerie protéolytique de l'hôte à leur avantage. Également, diverses conditions pathologiques sont associées à une augmentation de l'activité protéolytique. Ainsi, la furine est connue pour activer de nombreux précurseurs protéiques jouant des rôles importants dans différents processus physiologiques (ex : embryogenèse) et pathologiques tels que les infections virales et bactériennes, l'Alzheimer et le cancer.

### **1.6.1 L'embryogenèse**

Tel que mentionné précédemment, on attribue un rôle essentiel à la furine lors du développement embryonnaire. Selon l'analyse physiopathologique des embryons *fur* <sup>-/-</sup> ,

leur décès serait attribuable à une insuffisance hémodynamique due à l'incapacité du tube cardiaque à se fusionner ainsi qu'à des défauts dans la fermeture ventrale (Constam and Robertson, 2000b; Roebroek et al., 1998). La morphologie vasculaire du sac vitellin est également anormale, bien que les précurseurs de cellules sanguines et endothéliales soient formés. De plus, on observe une absence de rotation axiale et ce, malgré l'expression appropriée de deux marqueurs d'asymétrie droite-gauche, Nodal et eHand. L'expression tissulaire d'ARNm *fur* varie tout au long du processus de développement et est coordonnée avec celle de plusieurs substrats tels que le TGFβ1, le TGFβ2, le BMP-2,- 4, - 5, -6 et -7, le Nodal ainsi que le IGF (Collignon et al., 1996; Dickson et al., 1993; Jones et al., 1991; Lyons et al., 1995; Roebroek et al., 1998; Winnier et al., 1995; Zheng et al., 1994). Ce chevauchement dans les patrons d'expression indique que la furine pourrait contribuer à l'activation *in vivo* d'au moins une partie de ces facteurs.

Plus particulièrement, il a été démontré au laboratoire que le TGFβ1 et le TGFβ2 sont efficacement clivés par la furine (Dubois et al., 2001; Dubois et al., 1995). De façon intéressante, des phénotypes similaires aux souris *fur* <sup>-/-</sup>, en ce qui a trait à l'incapacité à développer de larges vaisseaux sanguins dans le sac vitellin et à la mort embryonnaire au 11<sup>e</sup> jour, sont également observés chez des modèles transgéniques déficients pour le TGFβ1 (Dickson et al., 1995). De plus, chez les embryons *fur* <sup>-/-</sup>, l'allantum, un tissu exprimant des niveaux élevés d'ARNm *fur*, est incapable de se fusionner avec le chorion. La fusion chorionallantoïque est également abolie chez les embryons déficients en BMP-5 et -7, deux membres de la famille du TGFβ (Solloway and Robertson, 1999). Ces observations suggèrent donc que des défauts dans la signalisation, résultant de l'activation

inadéquate de facteurs de croissance, contribuent aux malformations observées chez les souris déficientes en furine.

### **1.6.2 Les infections virales et bactériennes**

En plus de son implication dans les processus physiologiques présentés ci-haut, on attribue un rôle important à la furine dans l'établissement de certaines pathologies. L'activation protéolytique par la furine de glycoprotéines d'enveloppes virales ainsi que de toxines de bactéries confèrent la virulence à un bon nombre de ces pathogènes. Par exemple, le clivage au site de reconnaissance furine contenu dans la glycoprotéine GP du virus Ebola est directement relié à sa létalité chez les humains (Volchkov et al., 1998). La protéine GP des souches virales d'Ébola provenant du Zaïre (l'actuelle République démocratique du Congo) et de la Côte d'Ivoire, qui causent une fièvre hémorragique fulminante, contient à son site d'activation un motif dibasique (R-T-R-R↓) qui est efficacement clivé par la furine. Par contre, un tel site de clivage est absent dans la protéine GP du virus Ebola Reston, un virus non-pathogène. Plusieurs autres virus nécessitent l'activation protéolytique de glycoprotéines à des sites de reconnaissances furine afin d'acquérir leur virulence. C'est le cas entre autres du cytomégalo virus humain, de l'influenza aviaire, de l'Epstein-Barr, du virus de la fièvre jaune, de la rougeole ainsi que du VIH (Jean et al., 2000; Maisner et al., 2000; Moulard and Decroly, 2000; Moulard et al., 1999; Watanabe et al., 1995; Zambon, 2001).

Les PC jouent également un rôle clé dans l'activation de toxines de bactéries, telles que l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*, la toxine diphtérique, la neurotoxine tétanus



et la toxine de l'anthrax (Beauregard et al., 2000; Gordon et al., 1995; Gu et al., 1996; McKee and FitzGerald, 1999; Molloy et al., 1992; Taylor et al., 2003). Ces dernières, exprimées sous forme de polypeptides, sont activées protéolytiquement à un site de reconnaissance furine à la surface des cellules cibles ou encore dans les compartiments endosomaux. Une perte de sensibilité partielle ou complète face à ces toxines a été observée chez des cellules déficientes en furine active. La surexpression de la furine de type sauvage a permis de mettre en évidence la participation de cette convertase dans la maturation des différentes toxines bactériennes. La transfection de PACE4 a également restauré la maturation de diverses toxines, mais à un niveau moindre (Sucic et al., 1999).

### 1.6.3 L'Alzheimer

Les PC ont aussi été liées à des désordres neuro-dégénératifs. L'amyloïde- $\beta$ , la principale composante des plaques séniles dans la maladie d'Alzheimer, est générée par l'activité protéolytique de la BACE (*beta site amyloid precursor protein cleaving enzyme*) (Vassar et al., 1999). Il a été démontré que le clivage de la pro-BACE par des convertases de type furine augmente son activité (Benjannet et al., 2001; Creemers et al., 2001). Également, la protéine CLAC (*collagen-like Alzheimer amyloid plaque component*), une composante nouvellement identifiée des plaques amyloïdes, est relâchée par excision de sa molécule précurseure à un motif efficacement clivé par de la furine recombinante (Hashimoto et al., 2002).

#### 1.6.4 Le cancer

Différentes études appuient l'hypothèse voulant que les PC et plus particulièrement la furine, jouent un rôle dans la genèse et la progression de désordres prolifératifs tels que le cancer. Des niveaux d'expression élevés de PC ont été rapportés chez plusieurs cancers humains et lignées de cellules tumorales, tel que résumé au tableau VI (Khatib et al., 2002). Des analyses de biopsies de cancers humains ont d'abord révélé une forte expression de la furine dans des tumeurs de poumons de stades avancés (Mbikay et al., 1997a). Puisque l'expression de la furine a subséquemment été associée avec le niveau d'agressivité de différents types de cancers, incluant le cancer du sein (Cheng et al., 1997) et de la tête et du cou (Bassi et al., 2001b), on propose une valeur pronostique à l'expression de la furine dans les tumeurs. Des études *in vivo* ont démontré que la transfection stable de la furine cause une augmentation significative du potentiel invasif et du volume des tumeurs formées chez des souris Scid à partir des lignées tumorales humaines, SSC12 et SSC15, issues de cancers de la tête et du cou (Bassi et al., 2003). D'autre part, des études de xénogreffes chez des souris immunodéficientes utilisant les lignées cellulaires humaines de leucémie (Jurkat T), de carcinome de colon (HT-29) (Khatib et al., 2001), d'astrocytomas (U87MG et U118MG) (Mercapide et al., 2002), de carcinome de la tête et du cou (SCC15, A253 et Detroit 562) (Bassi et al., 2001a) ont révélé que l'expression de l'inhibiteur de la furine, l' $\alpha$ 1-PDX, inhibe l'incidence, la croissance, la capacité d'invasion et l'angiogenèse tumorale. L'impact de la furine sur la tumorigenèse serait attribuable à sa capacité à maturer/activer des substrats notoires qui sont impliqués directement ou indirectement dans chacun de ces processus.

**Tableau VI : Expression des convertases de proprotéines chez différents cancers humains et lignées de cellules tumorales.**

	<b>Convertases exprimées</b>	<b>Références</b>
<b><u>Tumeurs humaines</u></b>		
Adénomes pituitaires	PC1, PC2	Takumi, <i>et al.</i> , 1998 Seidah <i>et al.</i> , 1997
Tumeurs de la tête et du cou	<b>Furine</b> , PACE4	Bassi <i>et al.</i> , 2001
Tumeurs du sein	<b>Furine</b> , PC1, PACE4, PC7	Cheng, <i>et al.</i> , 1997
Tumeurs des poumons	<b>Furine</b> , PC1, PC2, PACE-4	Mbikay, <i>et al.</i> , 1997
<b><u>Lignées cellulaires tumorales</u></b>		
Adénomes pituitaires (HP75, Att-20)	<b>Furine</b> , PC1, PC2, PACE4	Seidah, <i>et al.</i> , 1994; Jin, <i>et al.</i> , 1999; Rovere, <i>et al.</i> , 1996
Carcinomes thyroïde médulaire (rMTC6-23)	<b>Furine</b> , PC2	Rovere, <i>et al.</i> , 1996
Carcinomes de la tête et du cou (SCC9, SCC12, SCC13, SCC15, SCC71, A253, det.262, FaDu)	<b>Furine</b> , PACE4	Bassi <i>et al.</i> , 2001
Glioblastomes (Lin-18, U138MG, U87MG, D247MG, T98G, LN-229, U373MG, LN-308, LN-428, U251MG)	<b>Furine</b>	Leitlein, <i>et al.</i> , 2001
Cancer des poumons (H82, H345, H520, H209, H354, H510, H69, H146)	<b>Furine</b> , PC1, PC2	Mbikay, <i>et al.</i> , 1997 Rounseville, <i>et al.</i> , 2000
Cancer du pancréas (RIN5F, 027B2)	<b>Furine</b> , PC1, PC2	Yoon, <i>et al.</i> , 1997 Itoh, <i>et al.</i> , 1996
Cancer du sein (MCF-7, ZR-75-1, T-470, BT-20, MDA-MB-157, MDA-MB-468, MDA-MB-231)	<b>Furine</b> , PC1, PACE4, PC7	Cheng, <i>et al.</i> , 1997 Brar, <i>et al.</i> , 1999 Du <i>et al.</i> , 2001

	Convertases exprimées	Références
<b><u>Lignées cellulaires tumorales</u></b>		
Cancer de l'intestin (STC-1)	PC1, PC2	Yoon, <i>et al.</i> , 1997
Cancer du colon (HCT8, LoVo, HT29, LS174T, coloDM320, C119A)	PC5	Rovere, <i>et al.</i> , 1996
Cancer des gonades (H-500)	<b>Furine</b>	Liu, <i>et al.</i> , 1995

La furine participe à la maturation de facteurs de croissance qui favorisent la prolifération tumorale, tels que l'IGF-1 (Duguay et al., 1995), l'IGF-2 (Duguay et al., 1998), le PDGF-A (Siegfried et al., 2003b) et le TGF $\beta$ 1 (Dubois et al., 2001; Dubois et al., 1995). Il a été décrit précédemment que le milieu conditionné des cellules du pancréas MIN6 surexprimant la furine stimule la croissance de cellules parentales contrôles tandis que le milieu de cellules exprimant l' $\alpha$ 1-PDX donne lieu à un taux de prolifération beaucoup plus faible (Kayo et al., 1997). Ces observations suggèrent donc que la surexpression de la furine stimule la croissance via un mécanisme autocrine/paracrine. La furine peut également activer les récepteurs cellulaires, IGFR-1 (Khatib et al., 2001) et c-Met (Komada et al., 1993), qui transmettent respectivement les signaux cellulaires initiés par la liaison des facteurs de croissance IGF-1 et HGF.

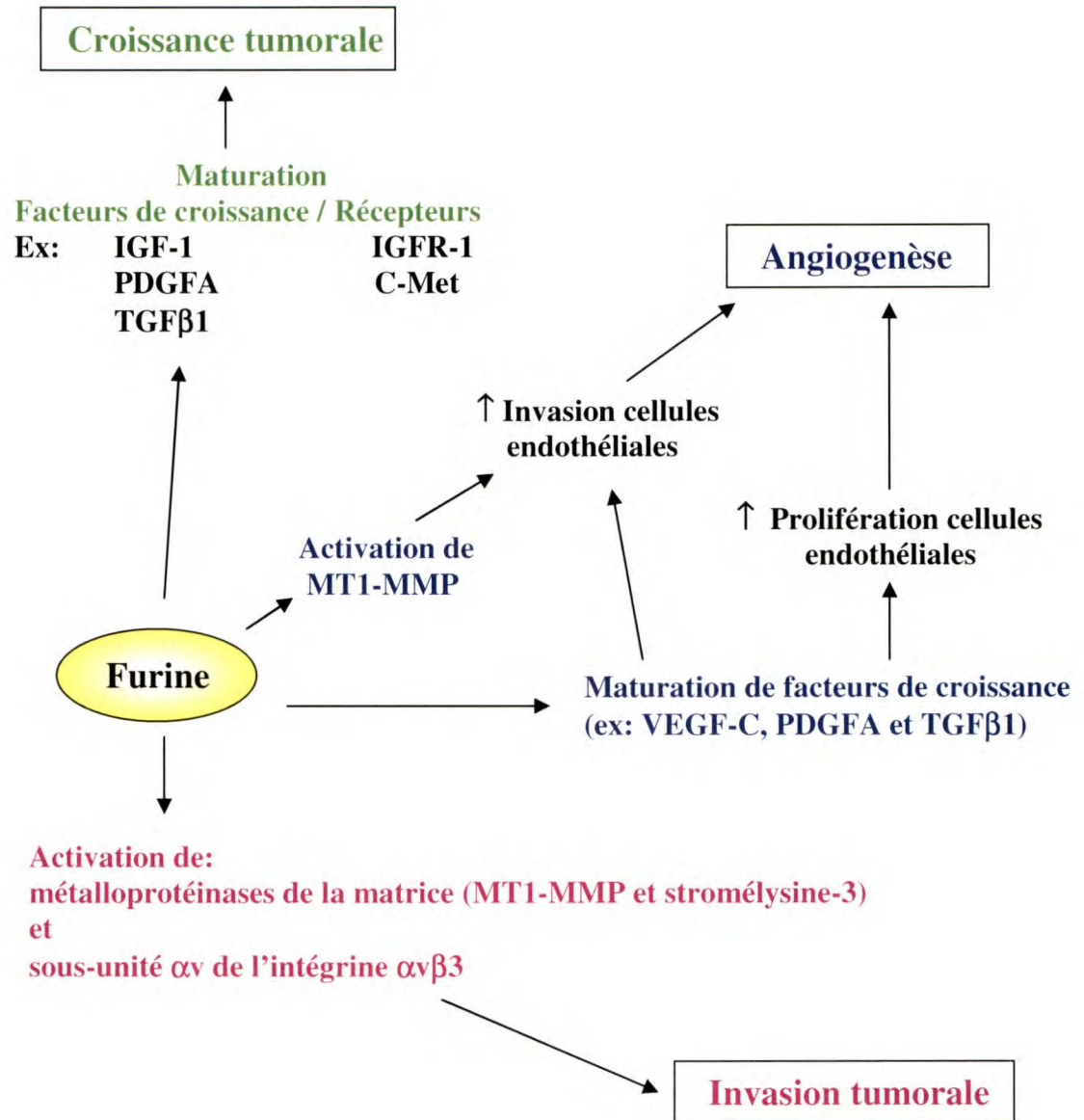
La furine a également un rôle bien établi dans le processus d'invasion tumorale. Les niveaux d'expression d'ARNm et de protéine furine corréleront avec l'aggressivité et la

capacité invasive de lignées de cellules tumorales dérivées de cancers du poumon et de la tête et du cou (Bassi et al., 2001b). La furine active des protéines directement impliquées dans le mécanisme d'invasion telles que les métalloprotéinases de la matrice (MMP) mais aussi des facteurs de croissances (ex : TGF $\beta$ 1) et des intégrines qui induisent l'expression d'enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire telles que l'urokinase et les MMP (Forbes et al., 2004; Kim et al., 2004; Levinson et al., 2004). Les cellules de carcinome de colon HT-29, qui expriment de façon stable l' $\alpha$ 1-PDX, démontrent une inhibition de leur capacité invasive qui est associée à une inhibition de la maturation de la MT1-MMP (Khatib et al., 2001), une métalloprotéinase dont l'implication dans le processus d'invasion tumorale est largement documentée (discuté plus loin). La furine est également impliquée dans l'activation de la stromélysine-3 (Pei and Weiss, 1995), un membre de la famille des MMP dont l'expression a été associée avec un accroissement de la tumorigénicité (Tetu et al., 1998). La sous-unité  $\alpha$ v de l'intégrine  $\alpha$ v $\beta$ 3, dont l'expression corrèle avec la capacité invasive des cellules tumorales, est également un substrat reconnu de la furine (Lehmann et al., 1996; Lissitzky et al., 2000; Rolli et al., 2003). De plus, les cellules HT-29 dont la furine est inhibée exhibent une diminution significative des niveaux d'ARNm uPA, tPA, uPAR et PAI-1, des molécules impliquées dans l'invasion mais dont l'activation serait indépendante de l'activité des PC (Khatib et al., 2001). Ces résultats indiquent donc une implication directe et indirecte de la furine dans l'invasion de cellules tumorales.

L'analyse immunohistochimique de l'antigène CD31, un marqueur des cellules endothéliales, a révélé une diminution de la vascularisation des tumeurs formées à partir de cellules exprimant l' $\alpha$ 1-PDX (Siegfried et al., 2003a). La furine participe à la

maturation de différents facteurs de croissance, tels que le VEGF-C, le PDGF-A et le TGF $\beta$ 1, qui induisent directement la prolifération des cellules endothéliales (Bernatchez et al., 2002; Dubois et al., 1995; Kumar et al., 1998; Siegfried et al., 2003a; Siegfried et al., 2003b). Ces facteurs peuvent également induire la production de facteurs pro-angiogéniques (ex : VEGF, MMP) par les cellules tumorales, stromales et endothéliales (Hagedorn et al., 2001; Puyraimond et al., 1999; Sugano et al., 2003). Tel que mentionné précédemment, la furine active la MT1-MMP, une métalloprotéinase impliquée dans la migration des cellules endothéliales (Chun et al., 2004; Yana and Weiss, 2000). Enfin, la VE-cadhérine, une molécule nécessaire à l'adhésion des cellules endothéliales entre elles, possède un motif de reconnaissance pour la furine à son site d'activation (Gory-Faure et al., 1999).

Ainsi, les essais d'inhibition et de surexpression de la furine témoignent de son importance dans le processus de progression tumorale. Jusqu'à maintenant quelques substrats de la furine ont été proposés en tant que médiateurs des ses effets protumorigéniques. Ils sont résumés à la figure 4. Toutefois, la participation d'autres molécules peut être envisagée étant donné le nombre et la diversité des substrats de la furine répertoriés jusqu'à maintenant. De plus, des études supplémentaires sont requises afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de cette convertase en condition tumorigénique.



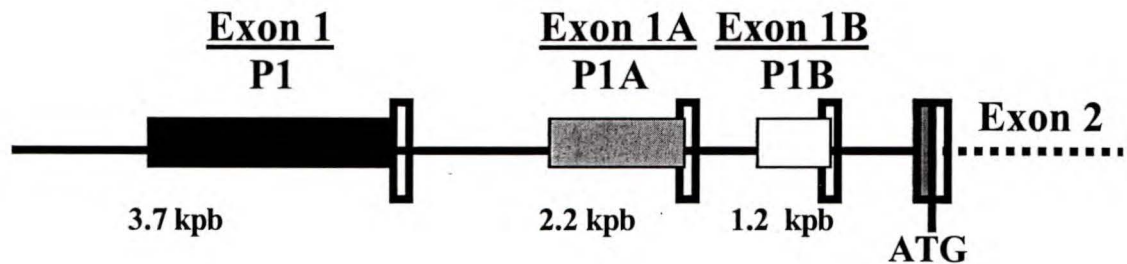
**Figure 4: Les rôles de la furine dans le processus de progression tumorale.** La furine est responsable de l'activation/maturation d'une panoplie de substrats qui participent activement aux différentes étapes du processus de la tumorigénèse. Quelques exemples de ces substrats sont représentés ci-haut.

### 1.7 La régulation de l'expression de la furine.

Le gène de la furine est constitué d'environ 20 kpb et la séquence codante est dispersée sur 15 exons, débutant à l'exon 2 et se terminant à l'exon 16 (Roebroek et al., 1986a). De façon intéressante, il a été démontré que la convertase furine est encodée par trois isoformes distincts d'ARNm (Ayoubi et al., 1994). Ces transcrits diffèrent dans leur région 5' mais sont traduits à partir du même codon AUG, résultant en des protéines identiques. À l'aide d'analyses d'extension utilisant des oligonucléotides (*primer extension analysis*), les sites d'initiation de la transcription de ces trois formes d'ARNm ont été définis. Les régions génomiques localisées immédiatement en amont des trois sites alternatifs de début de transcription, nommées exon 1, 1A et 1B, possèdent des activités promotrices. Ainsi, l'expression de la furine est régulée par trois promoteurs distincts, soit le P1, le P1A et le P1B, identifiés selon l'exon qui les encode (figure 5). Il semble que l'activité de chacun de ces promoteurs varie en fonction du type cellulaire. Par exemple, des expériences utilisant la luciférase en tant que gène rapporteur ont démontré que le promoteur P1 joue un rôle prédominant chez des lignées de cellules du foie (HepG2) et mégakaryocytaires (Dami) tandis que le promoteur P1A est le plus actif chez des lignées de cellules pulmonaires (NCI-H82) et chondrocytaires (ATDC5) (Ayoubi et al., 1994).

Des études initiales de caractérisation de chacun des trois promoteurs de la furine ont permis de les diviser en 2 catégories selon les motifs présents dans leur séquence respective (Ayoubi et al., 1994). Ainsi, le promoteur P1 de 3,7 kpb s'apparente à un promoteur inductible étant donné la présence des éléments TATA et CAAT dans sa région proximale. De plus, le promoteur P1, contrairement au P1A et au P1B, est transactivable par le facteur de transcription C/EBP $\beta$ . Les promoteurs P1A et P1B





Adapté de Ayoubi *et al.*, 1994

**Figure 5: L'organisation génétique de la région présente en 5' du gène de la furine humaine.** L'expression de la furine est régie, au niveau transcriptionnel, par l'activité de trois promoteurs distincts. Ces promoteurs, encodés par les exons 1, 1A et 1B, sont nommés respectivement P1, P1A et P1B. Le promoteur P1 possède des caractéristiques communes aux promoteurs inductibles, tandis que les promoteurs P1A et P1B s'apparentent aux promoteurs de type constitutif.

présentent plutôt des caractéristiques de promoteurs constitutifs puisqu'ils ne possèdent pas de boîte TATA et contiennent des séquences riches en GC ainsi que de nombreux sites de liaison pour le facteur de transcription SP1.

Bien que la découverte des promoteurs contrôlant l'expression de la furine remonte à 1994, encore bien peu d'informations sont disponibles quant à leur régulation. La majorité des données obtenues jusqu'à ce jour sont issues de travaux réalisés dans notre laboratoire. Ainsi, le Dr Blanchette a démontré que l'expression d'ARNm *fur* est augmentée chez des cellules fibroblastiques, hépatiques et synoviales suite à la stimulation avec son substrat, le TGF $\beta$ 1, ce qui engendre une boucle interne d'autorégulation (Blanchette et al., 1997). Cette régulation implique les Smad (*similar to mothers against decapentaplegic*), des éléments de la cascade d'activation induite par le TGF $\beta$  (discuté plus loin). Le Smad2 en association avec le Smad4 et FAST-1 ainsi que le Smad3 en association avec le Smad4 et AP-1 seraient responsables de l'induction de la transcription du gène *fur* par le TGF $\beta$ 1 (Blanchette et al., 2001b). De plus, il existe une coopération entre la voie des Smad et de la voie des MAP Kinases (MAPK) concernant l'amplification de la transcription du gène *fur*. Il a été démontré que la MAPK p42/44 est activée en réponse au TGF $\beta$ 1 et induit la localisation nucléaire de Smad2, entraînant ainsi l'augmentation de la transcription du gène *fur* (Blanchette et al., 2001a).

Par la suite, des études réalisées par la Dre Laprise ont mis en évidence l'augmentation rapide de l'expression et de l'activité protéolytique de la furine lors de la différenciation de cellules mégakaryoblastiques (Laprise et al., 2002). La différenciation de ces cellules conduit à la génération de plaquettes via un processus contrôlé impliquant l'expression

successive et coordonnée de facteurs de transcription. Le facteur GATA-1 est connu pour être essentiel à ce processus puisqu'il régule l'expression de plusieurs gènes mégakaryocytaires (Shivdasani et al., 1997). L'étude de l'activité des différents promoteurs de la furine chez une lignée mégakaryoblastiques humaines, les cellules Dami, différenciées au PMA, a indiqué que le promoteur P1 de la furine est le plus puissant et le plus sensible en réponse à l'expression ectopique de GATA-1. Une séquence de liaison GATA identifiée dans la région proximale de P1 serait requise pour son activité basale et induite en réponse au facteur de transcription GATA-1 (Laprise et al., 2002).

Une caractérisation plus exhaustive des promoteurs de la furine serait nécessaire afin de mieux comprendre les mécanismes qui régissent son expression dans le contexte du développement embryonnaire mais également dans le contexte de certaines pathologies telles que le cancer.

## **2. LE CANCER**

### **2.1 Le processus de progression tumorale.**

La carcinogenèse est un processus qui implique différents changements aux niveaux phénotypique et génétique. Une tumeur maligne possède plusieurs attributs phénotypiques tels que la croissance excessive, l'invasion locale ainsi que l'habilité à former des métastases à des sites distants de la tumeur primaire. Ces caractéristiques sont acquises de

façon successive via un phénomène que l'on nomme progression tumorale. Au niveau moléculaire, la progression est le résultat de l'accumulation d'altérations génétiques qui peut être favorisée par des défauts de la machinerie de réparation de l'ADN. Les changements génétiques qui alimentent la progression tumorale impliquent non seulement des gènes qui régulent la croissance, mais aussi des gènes impliqués dans l'angiogenèse, l'invasion et la formation de métastases (Michor et al., 2004). Il existe environ 100 types de cancers distincts, toutefois, six changements fondamentaux dans la physiologie cellulaire semblent collectivement dicter le phénotype malin. Ceux-ci incluent : 1) l'autonomie dans les signaux de croissance, 2) l'insensibilité face aux signaux inhibiteurs de la croissance, 3) l'évasion de l'apoptose, 4) la réplication illimitée (i.e. surmonter la sénescence cellulaire), 5) l'angiogenèse et 6) l'habilité à quitter le site primaire et à former des métastases (Hanahan and Weinberg, 2000).

D'abord, il existe différentes stratégies afin d'acquérir l'autonomie de prolifération. Celles-ci impliquent des altérations aux niveaux des signaux extracellulaires de croissance, des médiateurs de la signalisation et/ou des circuits intracellulaires qui traduisent ces signaux en action. Plusieurs cellules tumorales acquièrent l'habilité à synthétiser (ou à augmenter la synthèse) des facteurs de croissance, comme par exemple le PDGF, le TGF $\alpha$ , le TGF $\beta$ , le EGF, etc (Kambhampati et al., 2005; Spencer-Cisek, 2002; Yu et al., 2003). Également, les récepteurs à la surface cellulaire, qui transmettent les signaux prolifératifs, sont souvent surexprimés et deviennent hypersensibles au niveau ambiant de facteurs de croissance qui n'engendrerait normalement pas de prolifération. Par exemple, le récepteur de l'EGF est augmenté chez les tumeurs de l'estomac, du

cerveau et du sein (Takehana et al., 2003; von Bossanyi et al., 1998; Zhou and Hung, 2003). Des modifications structurales des récepteurs peuvent aussi induire la signalisation et la croissance de façon indépendante de la liaison du ligand. Des versions tronquées du récepteur à l'EGF, dénuées d'une partie de la queue cytoplasmique, sont constitutivement actives (Nagane et al., 1996). Les médiateurs cytoplasmiques qui reçoivent et traitent les signaux peuvent également être altérés. La cascade Ras-Raf-MAPK joue un rôle central dans le développement tumoral. Dans 25% des cancers humains, la protéine Ras est présente sous une forme mutée qui induit la libération d'un flux de signaux mitogéniques dans la cellule, et ce, sans stimulation par les régulateurs en amont (Medema and Bos, 1993). En plus de Ras, plusieurs autres oncogènes, incluant les protéines APC, src et PI3K, sont communément mutées dans divers cancers humains et engendrent la croissance autonome des cellules tumorales. Finalement, toutes les voies de signalisation agissent au noyau où elles ont un impact sur de nombreux gènes qui orchestrent le cycle mitotique de la cellule. Ainsi, l'autonomie de croissance peut être attribuée à la mutation de gènes qui régulent la transcription de l'ADN, tels que les oncoprotéines Myc, Jun et Rel ou à la mutation de cyclines et des kinases dépendantes des cyclines qui régissent l'entrée dans le cycle cellulaire (Malumbres and Carnero, 2003).

À l'intérieur d'un tissu sain, de multiples signaux anti-prolifératifs agissent de façon à maintenir la quiescence cellulaire et l'homéostasie tissulaire. Lors de la progression tumorale, les cellules acquièrent une insensibilité à ces signaux de différentes façons. La sensibilité des cellules tumorales aux agents anti-prolifératifs peut être interrompue en régulant à la baisse l'expression de récepteurs/médiateurs de la signalisation ou en exprimant des récepteurs/médiateurs de la signalisation mutés et non-fonctionnels

(Hanahan and Weinberg, 2000). Les effets anti-prolifératifs du TGF $\beta$ 1 sont parmi les mieux documentés et seront discutés plus loin.

La croissance des tumeurs n'est pas déterminée que par le taux de prolifération mais aussi par le taux de mortalité cellulaire. La survie cellulaire est régulée par des gènes qui contrôlent l'apoptose. Chez les cellules tumorales, des altérations au niveau des médiateurs de l'apoptose sont observées. Par exemple, certains cancers, dont des carcinomes hépatocellulaires, présentent des niveaux réduits du récepteur de mort CD95 aussi nommé Fas, ce qui rend les cellules moins susceptibles à l'apoptose induite par le ligand du Fas (FasL) (Lee et al., 2001). La protéine p53 est également un gène pro-apoptotique important puisqu'elle induit l'apoptose des cellules qui sont incapables de réparer les dommages causés à leur ADN. Cependant, dans plus de 70% des cancers humains, des défauts dans le gène encodant la p53 sont observés et engendrent la production d'une protéine inactive. Ainsi, chez ces cellules, les dommages à l'ADN subsistent et sont transmis lors de la division cellulaire, ce qui contribue à la transformation maligne. La surexpression de facteurs anti-apoptotiques tels que le BCL2 et/ou l'inhibition de l'expression de facteurs pro-apoptotiques sont aussi rapportées chez différents cancers (Krajewski et al., 1999). Des facteurs de croissances, tels que l'IGF-1, peuvent également induire des signaux de survie via la liaison et l'activation de leurs récepteurs (Baserga et al., 2003).

La plupart des cellules normales ont la capacité de se diviser entre 60 et 70 fois avant d'entrer dans une sénescence répllicative. Ce phénomène est attribuable au

raccourcissement progressif des télomères suivant chaque division cellulaire. Le maintien des télomères, et donc de la capacité de réplication, est observé virtuellement chez tous les types de cancers. Dans 85% à 95% des cas, ceci est dû à une régulation à la hausse de l'expression de l'enzyme télomérase, qui a pour fonction de maintenir les télomères à une longueur normale (Brunori et al., 2005; Bryan and Cech, 1999; Shay and Bacchetti, 1997).

Malgré les nombreuses anomalies génétiques présentées ci-haut, les tumeurs solides ne peuvent croître au-delà d'un diamètre de 1 à 2 mm sans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ce diamètre représente la distance maximale de diffusion des nutriments et de l'oxygène du sang vers les tissus (Hanahan and Folkman, 1996). La néovascularisation tumorale possède un double rôle, soit de fournir l'oxygène et les nutriments nécessaires au maintien des fonctions cellulaires et à la croissance de la tumeur, mais également, les cellules endothéliales nouvellement formées stimulent la croissance des cellules tumorales adjacentes en sécrétant des polypeptides tels que l'IGF, le PDGF et le GM-CSF (Pirtskhalaishvili and Nelson, 2000).

Le processus de néovascularisation est initié par un changement local dans l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques. Les facteurs pro-angiogéniques peuvent être produits par différents types cellulaires composant la tumeur, soit les cellules tumorales elles-mêmes, les cellules inflammatoires qui infiltrent la tumeur ainsi que les cellules endothéliales (Hanahan and Folkman, 1996). Le microenvironnement tumoral contient donc de nombreux stimuli qui modulent les différentes étapes du processus d'angiogenèse incluant la dégradation de la matrice extracellulaire, la prolifération, la migration ainsi que

la réorganisation structurale des cellules endothéliales en vaisseau sanguin. Les facteurs angiogéniques majeurs sont le VEGF, le bFGF, le PDGF, le TGF $\beta$ 1, le HGF et l'IL-8 (Beckner, 1999; Costa et al., 2004; Streit and Detmar, 2003). Plus particulièrement, le VEGF joue un rôle central dans le processus de néovascularisation (Ferrara, 2005). Il est un agent mitogénique spécifique, un facteur de survie et de chimioattraction pour les cellules endothéliales. L'injection d'anticorps anti-VEGF a significativement inhibé la croissance et la densité microvasculaire de tumeurs sous-cutanées chez des souris immuno-déficientes (McCrudden et al., 2003). Ce facteur de croissance induit ses effets via les récepteurs tyrosines kinases flt-1 et KDR/flk-1 qui sont exprimés de façon prédominante à la surface des cellules endothéliales en prolifération (Neufeld et al., 1999). Plusieurs agents pro-angiogéniques nommés ci-haut augmentent l'expression de VEGF, ce qui suggère que leurs effets sur la néovascularisation tumorale sont attribuables, du moins en partie, à la régulation de la production de VEGF (Shih and Claffey, 2001; Zhang et al., 2003). Également, lorsque le diamètre de la tumeur en croissance excède la capacité d'approvisionnement en sang, des régions hypoxiques (de carence en oxygène) apparaissent au sein de tumeurs solides (Chapman, 1984). L'hypoxie régule à la hausse la production de VEGF, mais aussi d'autres facteurs pro-tumorigéniques, via l'action du facteur de transcription HIF-1 (discuté plus loin) (Forsythe et al., 1996).

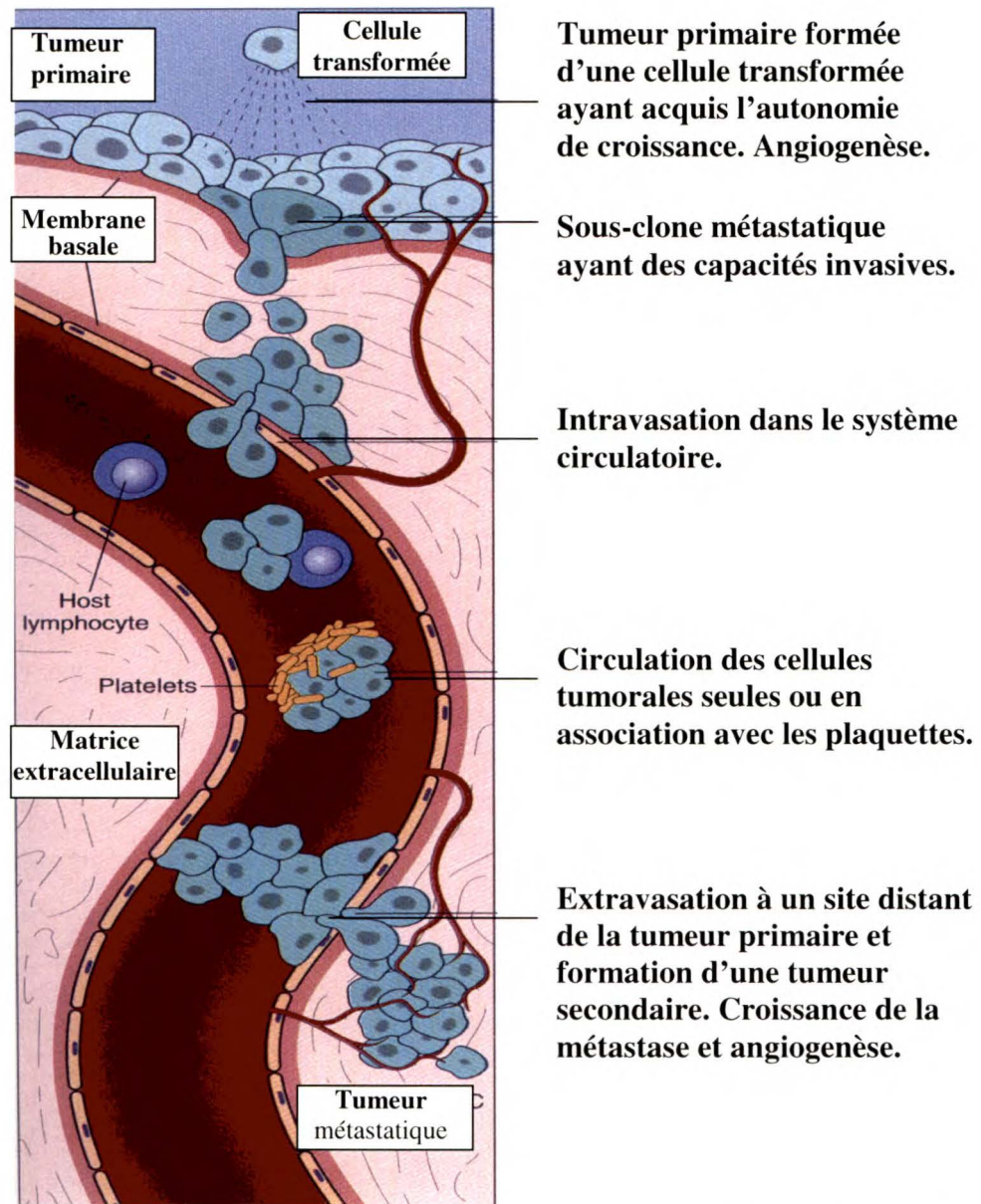
De façon concomitante à la prolifération et à l'appel chimiotaxique des cellules endothéliales vers la tumeur, le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) est essentiel. En plus de créer une route pour les cellules endothéliales en migration, la



dégradation protéolytique de la MEC permet la libération de facteurs pro-angiogéniques qui peuvent y être stockés, tels que le VEGF, le bFGF et le TGFβ1 (Dallas et al., 1995; Goerges and Nugent, 2004; Kanematsu et al., 2004). Diverses protéases participent à ce processus dont les MMP et la plasmine. L'expression de ces enzymes par les cellules endothéliales est régulée par plusieurs des facteurs pro-angiogéniques tels que le TGFβ1 et le PDGF (Kanaki et al., 2002; Puyraimond et al., 1999). De plus, l'adhésion cellule-cellule et cellule-substrat est fondamentale à la migration et à la morphogenèse des cellules endothéliales. La jonction adhérente VE-cadhérine, exclusivement exprimée à la surface des cellules endothéliales, est importante pour l'adhésion cellule-cellule et contribue à l'assemblage des nouveaux vaisseaux sanguins (Gory-Faure et al., 1999). De façon similaire, les intégrines αvβ3 et αvβ5, qui sont surexprimées par les cellules endothéliales lors du processus d'angiogenèse, favorisent, via leur liaison à la MEC, la migration des cellules endothéliales et la morphogenèse des vaisseaux sanguins (Stupack and Cheresch, 2004).

Le processus d'angiogenèse ne supporte pas seulement la croissance tumorale mais aussi la formation de métastases en fournissant une voie d'accès au système sanguin. La cascade métastatique est le processus par lequel les cellules tumorales s'échappent de la tumeur primaire et développent des tumeurs à des sites secondaires, généralement dans des organes hautement irrigués tels que les poumons et le foie. Les événements clés de cette cascade sont l'invasion du tissu conjonctif interstitiel et de la membrane basale des vaisseaux sanguins, l'intravasation dans le système circulatoire, l'extravasation à un site distant de la tumeur primaire et la formation de nouvelles tumeurs (Hanahan and

Weinberg, 2000). La première étape nécessaire à l'initiation de la cascade métastatique consiste en un détachement des cellules tumorales les unes des autres. Par exemple, la jonction adhérente E-cadhérine maintient les cellules épithéliales ensemble et transmet des signaux anti-prolifératifs aux cellules. Chez la plupart des cancers épithéliaux, les fonctions de la E-cadhérine sont perdues ce qui permet le relâchement des cellules de la masse primaire (Hirohashi and Kanai, 2003). La seconde étape implique l'attachement des cellules tumorales aux éléments de la MEC qui fournit un point d'ancrage pour leur propulsion. Chez plusieurs cancers, l'attachement au stroma est facilité par la perte d'intégrines qui lient la MEC normale et leur remplacement par des intégrines ( $\alpha 3 \beta 1$  et  $\alpha v \beta 5$ ) qui lient des éléments de la MEC dégradés par des protéases (Giannelli et al., 2002; Jones et al., 1997). L'étape finale consiste en la dégradation du tissu conjonctif interstitiel et de la membrane basale des vaisseaux sanguins, ce qui donne accès aux cellules tumorales au système vasculaire. Les tumeurs sécrètent elles-mêmes ou induisent les cellules stromales à produire des protéases (Wells et al., 2002). Le processus d'invasion implique principalement les MMP, incluant des gélatinases, des collagénases et des stromélysines (discuté plus loin). Les étapes du processus de progression tumorale sont résumées à la figure 6.



Adapté du livre *Basic Pathology*, 7<sup>th</sup> edition, 2005

**Figure 6: Représentation schématique du processus de progression tumorale.** Les cellules de la tumeur primaire acquièrent des attributs phénotypiques incluant la capacité de croissance excessive, de néovascularisation et d'invasion, ce qui favorise la formation de métastases à des sites distants de la tumeur primaire.

## 2.2 Le facteur de transcription HIF-1.

Le facteur de transcription inductible à l'hypoxie (HIF-1) est un médiateur clé de l'adaptation cellulaire et tissulaire à de faibles concentrations d'oxygène. L'impact du HIF-1 sur la biologie cellulaire est illustré par le nombre de gènes cibles ainsi que par le rôle de ce facteur de transcription dans l'embryogenèse. Les embryons HIF-1  $-/-$  présentent des malformations cardiovasculaires ainsi que des déficiences dans le développement neuronal et meurent au jour embryonnaire 10.5, ce qui témoigne de la nécessité du HIF-1 dans le processus normal du développement (Kotch et al., 1999). Depuis sa découverte, il a été démontré que l'expression de plus de 70 gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires telles que l'érythropoïèse, l'angiogenèse, l'homéostasie du fer, le métabolisme du glucose ainsi que la prolifération et la survie cellulaire est modulée par le HIF-1 (tableau VII) (Semenza, 2003). Par exemple, l'érythropoïétine (Epo), la protéine qui a mené à la découverte du HIF-1 en 1992, est un gène cible typique de la réponse à l'hypoxie (Semenza and Wang, 1992). L'Epo joue un rôle essentiel dans l'adaptation à l'hypoxie puisqu'elle induit l'érythropoïèse ce qui augmente la disponibilité systémique d'O<sub>2</sub> (Erslev, 1964).

Tous les gènes régulés par le HIF-1 possèdent une séquence HRE (élément de réponse à l'hypoxie) dans leur promoteur. La séquence consensus minimale pour la liaison du HIF-1, nommée HBS (*hypoxia-binding sequence*), est 5'-RCGTG-3' dans laquelle R=A/G (Jiang et al., 1996). Différents travaux ont démontré que pour plusieurs gènes, l'obtention d'une induction maximale en hypoxie nécessite un HRE composé d'un HBS et d'un HAS

**Tableau VII : Liste non-exhaustive de gènes dont l'expression est régulée par le facteur de transcription HIF-1.**

Gènes et fonctions	Références
<b>Transport de l'oxygène : érythropoïèse et métabolisme du fer</b>	
Érythropoïétine	Wang <i>et al.</i> , 1993
Transferrine	Rolfs <i>et al.</i> , 1997
Récepteur de la transferrine	Tacchini <i>et al.</i> , 1999; Lok <i>et al.</i> , 1999
Céruloplasmine	Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2000
<b>Transport de l'oxygène : régulation vasculaire</b>	
VEGF	Forsythe <i>et al.</i> , 1996
Flt-1 (récepteur de VEGF)	Gerber <i>et al.</i> , 1997
PAI-1	Kietzmann <i>et al.</i> , 1999
iNOS	Melillo <i>et al.</i> , 1995; Palmer <i>et al.</i> , 1998
Oxygénase de hème 1	Lee <i>et al.</i> , 1997
Adrénomedulline	Nguyen <i>et al.</i> , 1999
Récepteur $\alpha_{1B}$ -adrénergique	Eckhart <i>et al.</i> , 1997
Endothéline-1	Michenko <i>et al.</i> , 2000
<b>Énergie en anaérobie : prise du glucose et glycolyse</b>	
Transporteur de glucose 1	Ebert <i>et al.</i> , 1995
PFKFB3	Minchenko <i>et al.</i> , 2001
Phosphofructokinase L	Semenza <i>et al.</i> , 1994
Aldolase A	Semenza <i>et al.</i> , 1996
Aldolase C	Semenza <i>et al.</i> , 1994
GAPDH	Graven <i>et al.</i> , 1999
Phosphoglycérate kinase 1	Firth <i>et al.</i> , 1994; Semenza <i>et al.</i> , 1996
Enolase 1	Semenza <i>et al.</i> , 1994; Semenza <i>et al.</i> , 1996
Lactate déshydrogénase A	Firth <i>et al.</i> , 1995
<b>Prolifération et survie cellulaire :</b>	
IGF-2	Feldser <i>et al.</i> , 1999
IGF-BP1	Tazuke <i>et al.</i> , 1998
IGF-BP2	Feldser <i>et al.</i> , 1999
IGF-BP3	Feldser <i>et al.</i> , 1999
TGF- $\alpha$	Krisnamachary <i>et al.</i> , 2003
NOS2	Melillo <i>et al.</i> , 1995

Gènes et fonctions	Références
<b>Apoptose :</b>	
Nucléophosmine	Li <i>et al.</i> , 2204
NIP3	Bruick <i>et al.</i> , 2000; Sowter <i>et al.</i> , 2001
NIX	Sowter <i>et al.</i> , 2001
<b>Métabolisme de la matrice extracellulaire :</b>	
Cathepsine D	Krisnamachary <i>et al.</i> , 2003
Collagène de type V	Wykoff <i>et al.</i> , 2000
Fibronectine 1	Krisnamachary <i>et al.</i> , 2003
MMP-2	Krisnamachary <i>et al.</i> , 2003
PAI-1	Kietzmann <i>et al.</i> , 1999
Prolyl-4-hydroxylase $\alpha$	Takahashi <i>et al.</i> , 2000
uPAR	Krisnamachary <i>et al.</i> , 2003
Kératine 14/18/19	Krisnamachary <i>et al.</i> , 2003
Vimentine	Krisnamachary <i>et al.</i> , 2003
<b>Facteurs de transcription :</b>	
Dec1	Miyazaki <i>et al.</i> , 2002
Dec2	Miyazaki <i>et al.</i> , 2002
ETS-1	Oikawa <i>et al.</i> , 2001
<b>Régulateurs de l'activité de HIF-1 :</b>	
PHD1	Erez <i>et al.</i> , 2004
PHD2	Metzen <i>et al.</i> , 2004
<b>Autres:</b>	
Rétrotransposon VL30	Estes <i>et al.</i> , 1995
Isomérase triosephosphate	Iyer <i>et al.</i> , 1998
Transglutaminase 2	Wykoff <i>et al.</i> , 2000
Leptine	Grosfeld <i>et al.</i> , 2002
Anhydrase carbonique 9	Wykoff <i>et al.</i> , 2000
Hexokinase 1	Iyer <i>et al.</i> , 1998
Hexokinase 2	Iyer <i>et al.</i> , 1998
Téломérase hTERT	Yatabe <i>et al.</i> , 2004, Nishi H <i>et al.</i> , 2004

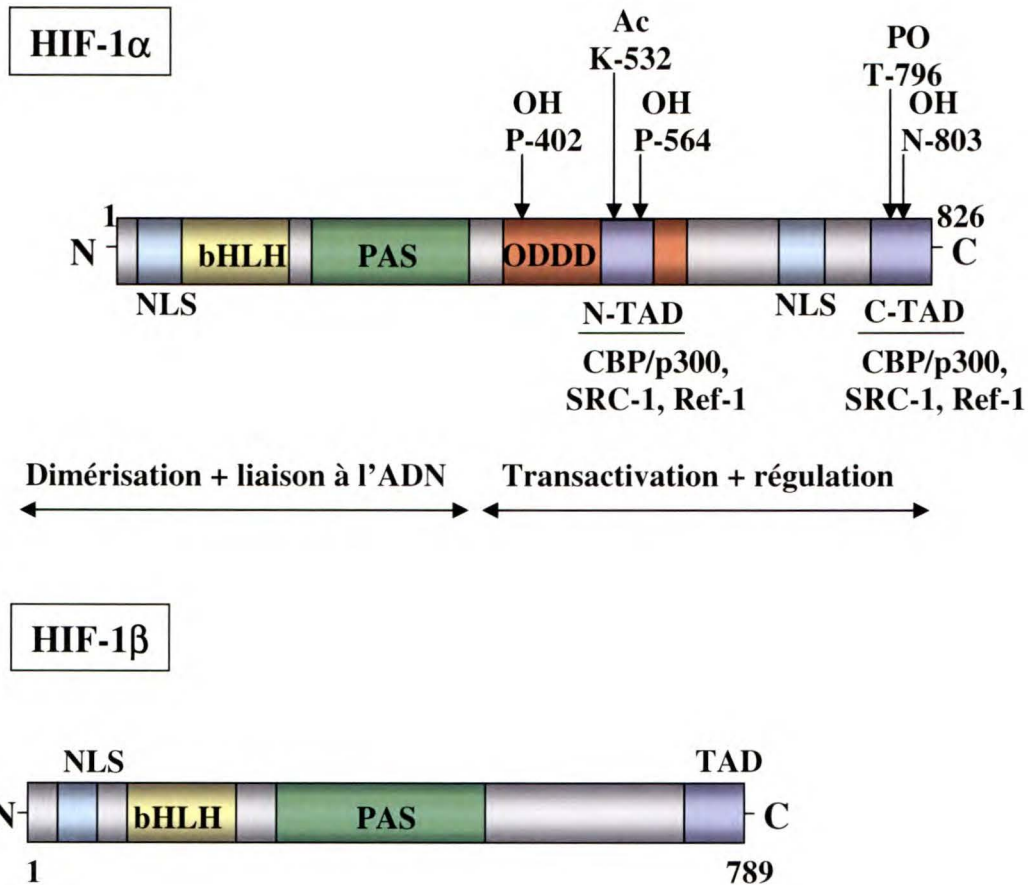
Adapté de Semenza *et al.*, 2002 et Lee *et al.*, 2004

(*HIF-1 ancillary sequence*) dont le motif (5'-CACG/AG/T/C-3') forme une séquence imparfaite et inversée du HBS (Kimura et al., 2001).

### **2.2.1 La structure du HIF-1.**

Le facteur de transcription HIF-1 est un hétérodimère composé des sous-unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ . Le HIF-1 $\beta$  est retrouvé chez les cellules de façon indépendante à la concentration en oxygène, alors que le HIF-1 $\alpha$  est virtuellement indétectable en conditions normales d'oxygène (21% d'O<sub>2</sub>) (Huang et al., 1996; Wang et al., 1995). Ainsi, les fonctions transcriptionnelles du HIF-1 dépendent étroitement de la disponibilité de la sous-unité régulable HIF-1 $\alpha$ .

Le gène encodant le HIF-1 $\alpha$  humain se situe au chromosome 14 (14q21-q24) tandis que le gène du HIF-1 $\beta$  est localisé au chromosome 1 (1q21) (Johnson et al., 1993; Semenza et al., 1996). Tel que représenté à la figure 7, les sous-unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  sont des protéines relativement larges comprenant respectivement 826 et 789 acides aminés. Chacune de ces protéines contient un ou des signaux de localisation nucléaire (NLS) ainsi qu'un motif hélice-boucle-hélice basique (bHLH) (Kallio et al., 1998; Wang et al., 1995; Wang and Semenza, 1995). Le domaine basique de ce motif est essentiel pour la liaison à l'ADN tandis que le domaine HLH est responsable de la dimérisation des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du complexe HIF-1 (Michel et al., 2002). Une autre caractéristique commune aux deux sous-unités est la présence d'un domaine Per-ARNT-Sim (PAS) qui est également impliqué dans la dimérisation des sous-unités du HIF-1 et la liaison du complexe transcriptionnel à l'ADN (Wang et al., 1995). L'acronyme de ce domaine est issu des



Adapté de Déry *et al.*, 2005

**Figure 7: Représentation schématique des domaines fonctionnels du HIF-1α et du HIF-1β.** Les deux protéines contiennent un domaine hélice-boucle-hélice basique (bHLH) et un domaine Per/Arnt/Sim (PAS) qui permettent la dimérisation des deux sous-unités et la liaison à l'ADN. Les signaux de localisation nucléaire (NLS) sont impliqués dans la translocation au noyau du HIF-1α et β. Seul le HIF-1α contient des domaines de transactivation (TAD) fonctionnels qui peuvent lier des cofacteurs tels que le p300/CBP, le SRC-1 et le REF-1. La régulation de l'expression et de l'activité du HIF-1α implique des modifications post-traductionnelles qui consistent en l'hydroxylation (OH) des prolines 402 et 564 et de l'asparagine 803, l'acétylation (Ac) de la lysine 532 ainsi que la phosphorylation (PO) de la thréonine 796.



trois premières protéines chez lesquelles ce motif a été identifié, soit les protéines de *Drosophiles* period (Per) et single-minded (Sim) et la protéine de vertébrés AhR nuclear translocator (ARNT), subséquemment démontrée comme étant identique au HIF-1 $\beta$  (Hoφφμαν et al., 1991). En plus de ces domaines, le HIF-1 $\alpha$  possède des caractéristiques structurales particulières telles qu'un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODDD) qui est inclus entre les résidus 401 et 603 (Huang et al., 1998). Étant une protéine hautement labile en conditions normales d'oxygène, la dégradation spécifique du HIF-1 $\alpha$  en normoxie est régie par ce domaine (discuté plus loin). Le HIF-1 $\alpha$  contient également deux domaines de transactivation (TAD) qui sont responsables de l'activité transcriptionnelle du HIF-1. Le TAD en N-terminal (TAD-N) est inclus entre les résidus 531-575 tandis que le TAD en C-terminal (TAD-C) est retrouvé à l'extrémité de la protéine entre les résidus 786-826 (Jiang et al., 1997b; Pugh et al., 1997). Ces TAD, en plus d'être impliqués dans la liaison de coactivateurs tels que les protéines p300/CBP, SRC-1 et Ref-1, sont des cibles de modifications post-transcriptionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation et/ou l'hydroxylation (Bruick and McKnight, 2001; Carrero et al., 2000; Dames et al., 2002; Freedman et al., 2002; Jeong et al., 2002; Richard et al., 1999). La sous-unité HIF-1 $\beta$  contient aussi un TAD, mais ce domaine ne semble toutefois pas nécessaire à l'activité transcriptionnelle du HIF-1 (Jiang et al., 1996). Bien que les sous-unités HIF-1 $\alpha$  et  $\beta$  présentent des similitudes, les différences marquées quant à leur sensibilité à l'oxygène et leur capacité de transactivation indiquent que la sous-unité  $\alpha$  est la protéine pivot régulant la fonctionnalité du complexe HIF-1. En plus du HIF-1 $\alpha$ , d'autres isoformes de la sous-unité  $\alpha$  ont été identifiées et incluent les protéines HIF-2 $\alpha$  et HIF-3 $\alpha$ . Parmi ces protéines, la structure et les fonctions de la sous-unité 1 $\alpha$  ont été

étudiées de façon plus extensive tandis que les rôles des isoformes 2 $\alpha$  et 3 $\alpha$  ne sont pas encore connus en détail. Des études portant sur des lignées cellulaires déficientes pour les différentes sous-unités  $\alpha$  ont révélé que le HIF-1 $\alpha$  joue un rôle prédominant dans l'induction de gènes en hypoxie (Sowter et al., 2003). Toutefois, il est connu que le HIF-2 $\alpha$  est aussi régulé par des variations dans les conditions d'oxygène (Wiesener et al., 1998) et, contrairement au HIF-1 $\alpha$  qui est ubiquiste, son expression serait restreinte à certains types cellulaires tels que les cellules endothéliales et les macrophages (Talks et al., 2000; Tian et al., 1997). Quant au HIF-3 $\alpha$ , qui est caractérisé par l'absence de domaine de transactivation en C-terminal, on lui propose plutôt un rôle d'antagoniste naturel du HIF-1 puisqu'il prévient l'interaction entre le HIF-1 $\alpha$  et le HIF-1 $\beta$  (Hara et al., 2001).

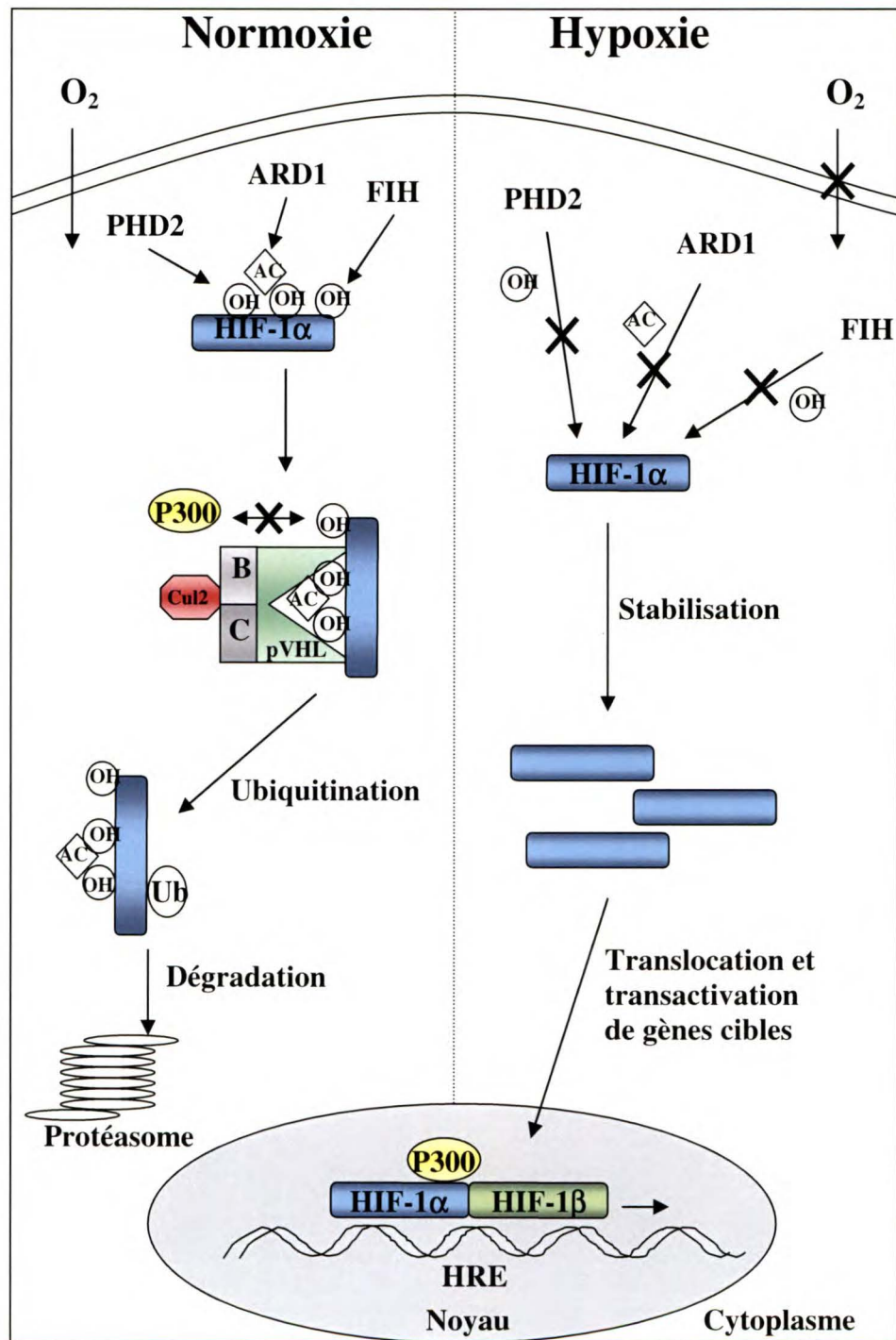
### **2.2.2 L'activation du HIF-1 par l'hypoxie.**

Tel que mentionné précédemment, l'activité du HIF-1 est dépendante de la disponibilité de la sous-unité HIF-1 $\alpha$ . Le gène encodant le HIF-1 $\alpha$  est exprimé de façon constitutive, tout comme le HIF-1. Cependant, en conditions normoxiques, la protéine HIF-1 $\alpha$  est extrêmement instable ayant une demie-vie de moins de 5 minutes, ce qui permet de maintenir ses niveaux sous les limites de détection (Jewell et al., 2001). De façon contraire, la dégradation rapide et continue du HIF-1 $\alpha$  est bloquée en hypoxie, ce qui occasionne une augmentation exponentielle des niveaux de la protéine en conditions *in vitro* et *in vivo* (Jiang et al., 1996). Ceci permet sa dimérisation avec la sous-unité  $\beta$  afin de former un complexe HIF-1 actif. La modification des taux de transcription et de traduction du HIF-1 $\alpha$  ne semble pas contribuer à sa disponibilité en conditions de faibles

tensions d'oxygène puisqu'ils demeurent inchangés lors du passage de la normoxie à l'hypoxie (Huang et al., 1996; Lang et al., 2002; Li et al., 1996).

Les bases moléculaires menant à la destruction du HIF-1 $\alpha$  en conditions normales d'oxygène ont récemment été identifiées et consistent en l'hydroxylation, l'ubiquitination et la dégradation du HIF-1 $\alpha$  via la voie des protéasomes (figure 8). D'abord, l'hydroxylation du HIF-1 $\alpha$  peut être réalisée, chez les mammifères, par trois prolyl hydroxylases nommées PHD1-3 (*prolyl hydroxylase-domain containing protein*) (Masson et al., 2001). Ces homologues enzymatiques ont respectivement été désignées EGLN2-1 et 3, sur la base de leur homologie avec l'Egl-9, la prolyl hydroxylase du HIF-1 $\alpha$  chez le *Caenorhabditis elegans* (Epstein et al., 2001). Les PHD hydroxylent le HIF-1 $\alpha$  sur deux résidus proline distincts, soit les Pro402 et Pro564, qui sont contenus dans le ODDD et font partie d'une séquence consensus conservée LXXLAP (Epstein et al., 2001). L'activité de ces enzymes est gouvernée par la concentration intracellulaire d'O<sub>2</sub>, ce qui leur confèrent un rôle de protéines senseurs d'oxygène. En plus de l'oxygène, les PHD requièrent du fer et du 2-oxoglutarate en tant que cofacteurs afin d'atteindre leur activité maximale (Epstein et al., 2001). C'est pourquoi des chelateurs (desferrioxamine) et des antagonistes du fer (CoCl<sub>2</sub>) sont fréquemment utilisés pour imiter les effets de l'hypoxie (Wang and Semenza, 1995). En plus de contrôler l'activité des PHD, les concentrations en oxygène régulent l'expression de leur ARNm via l'action du HIF-1, ce qui crée une boucle de rétroaction négative capable d'induire rapidement la dégradation du HIF-1 $\alpha$

**Figure 8: La régulation du facteur de transcription HIF-1 en normoxie et en hypoxie.** En condition normale d'oxygène, le HIF-1 $\alpha$ , la sous-unité régulable du HIF-1, est hydroxylé (OH) aux résidus prolines 402 et 564 par la prolyl hydroxylase PHD2. Cette hydroxylation permet la liaison de la protéine von Hippel Lindau (pVHL), une composante, tout comme la culline2 (Cul2), l'élongine B (B) et l'élongine C (C), du complexe E3-ubiquitine ligase. L'ubiquitination par ce complexe induit la dégradation du HIF-1 $\alpha$  par les protéasomes (ubiquitine=Ub). La liaison du pVHL au HIF-1 $\alpha$  est aussi favorisée par l'acétylation (AC) de la lysine 532 par l'acétyltransférase ARD1. De plus, l'hydroxylation de l'asparagine 803 par le facteur inhibiteur du HIF-1 (FIH) bloque la liaison de p300/CBP (p300) et inhibe l'activité transactivationnelle du HIF-1. En condition hypoxique, l'activité des hydroxylases et de l'acétylase est réprimée, ce qui permet au HIF-1 $\alpha$  d'échapper à la dégradation, de se dimériser avec le HIF-1 $\beta$  au noyau et de transactiver le promoteur de gènes cibles contenant un élément de réponse à l'hypoxie (HRE).



Adapté de Mazure *et al.*, 2004 et Déry *et al.*, 2005

lors de la réoxygénation (Aprelikova et al., 2004; Berra et al., 2003; D'Angelo et al., 2003; Erez et al., 2004; Metzen et al., 2004). Metzen *et al.* ont examiné la localisation intracellulaire des différentes isoformes de PHD fusionnées à la protéine fluorescente verte (Metzen et al., 2003a). Les résultats indiquent que la PHD1 se localise spécifiquement au noyau, que la PHD2 se situe principalement dans le cytoplasme alors que la PHD3 ne semble pas avoir de localisation intracellulaire préférentielle. Ces observations, combinées au fait que les trois isoformes de PHD peuvent être co-exprimées dans une même cellule, ont amené une équipe de chercheurs à s'interroger sur les différentes fonctions que peuvent avoir ces hydroxylases en contexte *in vivo*. Ainsi, en utilisant de petits ARN d'interférence (siRNA), le groupe du Dr Pouyssegur a démontré que chacune des PHD possèdent des fonctions distinctes *in vivo* et que la PHD2 est la prolyl hydroxylase qui permet de maintenir des niveaux faibles du HIF-1 $\alpha$  en normoxie. En fait, l'inhibition de l'expression de la PHD2, contrairement à la PHD1 et à la PHD3, a occasionné la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  et la formation du complexe HIF-1 en normoxie (Berra et al., 2003).

Suite à son hydroxylation, le HIF-1 $\alpha$  est reconnu par le produit du suppresseur de tumeur von Hippel Lindau (pVHL) (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Maxwell et al., 1999; Ohh et al., 2000). La protéine pVHL, en association avec l'élongine B, l'élongine C et la culline 2, forme le complexe d'E3-ubiquitine ligase et établit des liens hydrogène avec les hydroxyprolines du HIF-1 $\alpha$  afin de faciliter son ubiquitination (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Lisztwan et al., 1999). La forme poly-ubiquitinée du HIF-1 $\alpha$  est ensuite reconnue et dégradée par les protéasomes de type 26S (Huang et al., 1998; Pugh et al.,

1997; Salceda and Caro, 1997). Il est intéressant de souligner l'existence du syndrome von Hippel Lindau, une maladie autosomale dominante très rare causée par des mutations dans le gène du pVHL. Ce syndrome est caractérisé par la perte de fonction du pVHL qui entraîne l'expression constitutive du HIF-1 ainsi que de ses gènes cibles tels que le VEGF, ce qui contribue à l'importante vascularisation d'une forme très agressive de tumeurs rénales (Friedrich, 2001; Kaelin, 2002). La liaison du HIF-1 $\alpha$  au pVHL est également modulée par l'acétylation de la lysine 532 située dans le domaine ODDD, par l'acétyltransférase ARD1 (Jeong et al., 2002). L'acétylation est la modification post-traductionnelle du HIF-1 $\alpha$  qui a été la plus récemment caractérisée. Cette acétylation semble être critique pour la dégradation du HIF-1 $\alpha$  via les protéasomes. En fait, la mutation K532R permet au HIF-1 $\alpha$  d'échapper à l'acétylation par l'ARD1 et inhibe sa liaison avec le pVHL, ce qui induit sa stabilisation. On suggère que l'acétylation engendrerait un changement conformationnel qui augmente l'efficacité d'interaction du HIF-1 $\alpha$  avec le pVHL. Puisque l'activité N-acétyltransférase n'est pas connue pour être dépendante de l'oxygène, on se serait attendu à ce que cette modification ait lieu en normoxie et en hypoxie. Toutefois, une diminution des niveaux d'ARNm de l'ARD1 a été observée en conditions hypoxiques, ce qui entraîne une diminution graduelle des niveaux d'acétylation du HIF-1 $\alpha$  au fur et à mesure que le temps d'exposition en hypoxie augmente (Jeong et al., 2002).

En plus de contrôler la stabilité du HIF-1 $\alpha$ , l'oxygène affecte également l'activité transcriptionnelle et de liaison à l'ADN du HIF-1. Cette régulation implique l'hydroxylation d'un résidu asparagine (Asn 803) situé à l'extrémité C-terminale du TAD-

C du HIF-1 $\alpha$  (Lando et al., 2002a; Lando et al., 2002b). Cette hydroxylation est catalysée par une asparagine hydroxylase nommée facteur inhibiteur du HIF-1 (FIH) (Lando et al., 2002a). Tout comme les PHD, le FIH nécessite pour son activité de l'O<sub>2</sub>, du fer et du 2-oxoglutarate (Safran and Kaelin, 2003). En normoxie, l'hydroxylation de l'Asn 803 mène à une inhibition stérique de l'interaction entre le co-activateur transcriptionnel CBP/p300 et HIF-1 $\alpha$  (Lando et al., 2002a; Lando et al., 2002b). Le co-facteur CBP/p300 est une histone acétyltransférase qui est recrutée par plusieurs facteurs de transcription. L'acétylation d'histones modifie la structure de la chromatine afin d'ouvrir le locus génomique, ce qui facilite l'activité transcriptionnelle (Carrozza et al., 2003).

En conditions hypoxiques, l'hydroxylation (prolines et asparagine) et l'acétylation du HIF-1 $\alpha$  sont inhibées. Ceci prévient la liaison du pVHL au HIF-1 $\alpha$  et, par conséquent, l'ubiquitination du HIF-1 $\alpha$ , ce qui occasionne une accumulation rapide du HIF-1 $\alpha$  dans les cellules. Le HIF-1 $\alpha$  est ensuite transloqué au noyau où il se dimérise avec le HIF-1 $\beta$ . Puis, via le recrutement de co-facteurs tels que le CPB/P300, le HIF-1 pourra lier le HRE contenu dans le promoteur de gènes cibles. Ces divers événements témoignent de la régulation stricte de l'expression et de l'activité du HIF-1 par l'oxygène.

### **2.2.3 L'activation du HIF-1 par des stimuli non-hypoxiques.**

De plus en plus d'évidences indiquent que la stimulation de différents types cellulaires avec des agents tels que des facteurs de croissances, des cytokines, des hormones vasculaires et de l'oxyde nitrique peut mener à l'induction et à l'activation du HIF-1



(Feldser et al., 1999; Gorlach et al., 2001; Jung et al., 2003a; Metzen et al., 2003b; Richard et al., 2000; Sandau et al., 2001; Stiehl et al., 2002; Tacchini et al., 2001; Zelzer et al., 1998). Contrairement à l'hypoxie, l'activation du HIF-1 par des stimuli non-hypoxiques semble être une réponse spécifique à la cellule et la stabilisation ne semble pas jouer un rôle prédominant dans l'accumulation du HIF-1 $\alpha$  en normoxie. En fait, la dégradation du HIF-1 $\alpha$  n'est pas inhibée lors de l'induction du HIF-1 en réponse à une variété de facteurs de croissances et de cytokines tels que l'insuline, le HGF, l'IGF-1, l'IGF-2 et l'IL-1 $\beta$  (Fukuda et al., 2002; Jiang et al., 2001; Page et al., 2002; Tacchini et al., 2004; Treins et al., 2002). Le principal mécanisme au centre de cette induction serait plutôt l'augmentation de la traduction de la protéine HIF-1 $\alpha$ . Cette augmentation semble suffisante pour renverser la balance entre la synthèse et la dégradation, favorisant l'accumulation du HIF-1 $\alpha$  en normoxie. Diverses études ont identifié la voie de la PI3 kinase et ses effecteurs en aval, le mTOR et la p70S6 kinase, en tant que médiateurs de l'augmentation de la traduction du HIF-1 $\alpha$ . Ce mécanisme implique l'activation du facteur eucaryote initiateur de la traduction 4F (eIF-4F) et/ou de la sous-unité ribosomale 6S. La PI3K/p70S6K phosphoryle la protéine 6S de la sous-unité ribosomale 40S, ce qui augmente les niveaux de traduction d'ARNm contenant un motif d'oligopyrimidines, une séquence de 4 à 14 pyrimidines, retrouvé à l'extrémité 5' de certains ARNm dont celui du HIF-1 $\alpha$  (Iyer et al., 1998). Également, la voie de signalisation de la PI3K, via l'action du mTOR, gouverne l'activité du eIF-4F. Le complexe eIF-4F se lie à la coiffe située à l'extrémité 5' de l'ARNm et permet le recrutement des ribosomes eucaryotes. L'activité du eIF-4E, la composante du eIF-4F qui lie directement la coiffe, est bloquée par l'interaction avec la protéine 4E-BP. Cette interaction est régie par la phosphorylation du

4E-BP par le mTOR puisque la forme hypo-phosphorylée de 4E-BP lie et séquestre le eIF-4F tandis que la forme hyper-phosphorylée du 4E-BP libère le facteur eIF-4F (Gingras et al., 2001; Raught et al., 2001).

En plus de l'augmentation de la traduction, d'autres mécanismes peuvent contribuer à induire l'expression et l'activité du HIF-1 en réponse à certains stimuli non-hypoxiques. Par exemple, les hormones vasoactives, angiotensine et thrombine, ainsi que le LPS augmentent respectivement le taux de transcription du gène encodant le HIF-1 $\alpha$  chez les cellules de muscles lisses vasculaires et les macrophages via l'activation de la voie de la PKC, une kinase qui stimule la transcription de gènes via le facteur Sp1 (Blouin et al., 2004; Page et al., 2002). Le HGF induit également l'augmentation des niveaux d'ARNm du HIF-1 $\alpha$  en normoxie (Tacchini et al., 2001; Tacchini et al., 2004). Toutefois, l'élévation des taux de transcription du HIF-1 $\alpha$  semble être restreinte à une faible proportion des stimuli non-hypoxiques étudiés jusqu'à maintenant. De façon intéressante, il a été démontré que certains stimuli, tels que le donneur de NO s-nitrosoglutathione (GNSO) et l'activation des récepteurs muscariniques M1 et M3, induisent la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  en normoxie via l'inhibition de son hydroxylation (Hirota et al., 2004; Metzen et al., 2003b). Des évidences démontrent que l'accumulation du HIF-1 $\alpha$  en réponse au GNSO résulte de l'inhibition de l'activité des PHD (Metzen et al., 2003b). Conséquemment, l'interaction HIF-1 $\alpha$ -pVHL est réprimée et l'ubiquitination du HIF-1 $\alpha$  est fortement atténuée en présence de NO.

Plusieurs études ont démontré que l'activité du HIF-1 peut être modulée par la phosphorylation. Différentes équipes de recherche ont indiqué que le HIF-1 $\alpha$  peut-être directement phosphorylé *in vitro* et *in vivo* par les MAPK p42/44 (Richard et al., 1999; Volmat et al., 2001). L'activation de la voie des MAPK p42/44 conduit à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle du complexe HIF-1 (Richard et al., 1999). Les acides aminés phosphorylés par cette voie de signalisation ne sont pas encore identifiés. Cependant, une étude récente a révélé que la phosphorylation de la thréonine à la position 796 du HIF-1 $\alpha$  augmente l'activité transcriptionnelle en prévenant l'hydroxylation de l'Asn-803 par le FIH (Lancaster et al., 2004). Également, le groupe de Jaime Caro a établi que les MAPK p42/44 peuvent phosphoryler le co-activateur CBP/p300, menant ainsi à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Sang et al., 2003). Contrairement à l'hypoxie, les stimuli non-hypoxiques tels que les hormones vasoactives et les facteurs de croissance activent fortement les MAPK p42/44 (Richard et al., 1999). Ainsi, l'induction de l'accumulation du HIF-1 $\alpha$  en association avec l'activation des MAPK p42/44 seraient impliquées dans l'augmentation de l'activité du HIF-1 en réponse à divers stimuli non-hypoxiques.

Des études immunohistochimiques, visant à mettre en lumière la colocalisation du HIF-1 avec les régions hypoxiques dans les tumeurs solides, ont démontré que dans bien des cas, le patron d'expression du HIF-1 $\alpha$  est homogène à l'intérieur de la masse tumorale (Aebersold et al., 2001; Janssen et al., 2002; Vukovic et al., 2001). Ceci suggère donc que la surexpression du HIF-1 $\alpha$  dans les tumeurs peut refléter la déplétion en O<sub>2</sub> mais également l'activation de la synthèse ou les altérations dans la voie de dégradation du

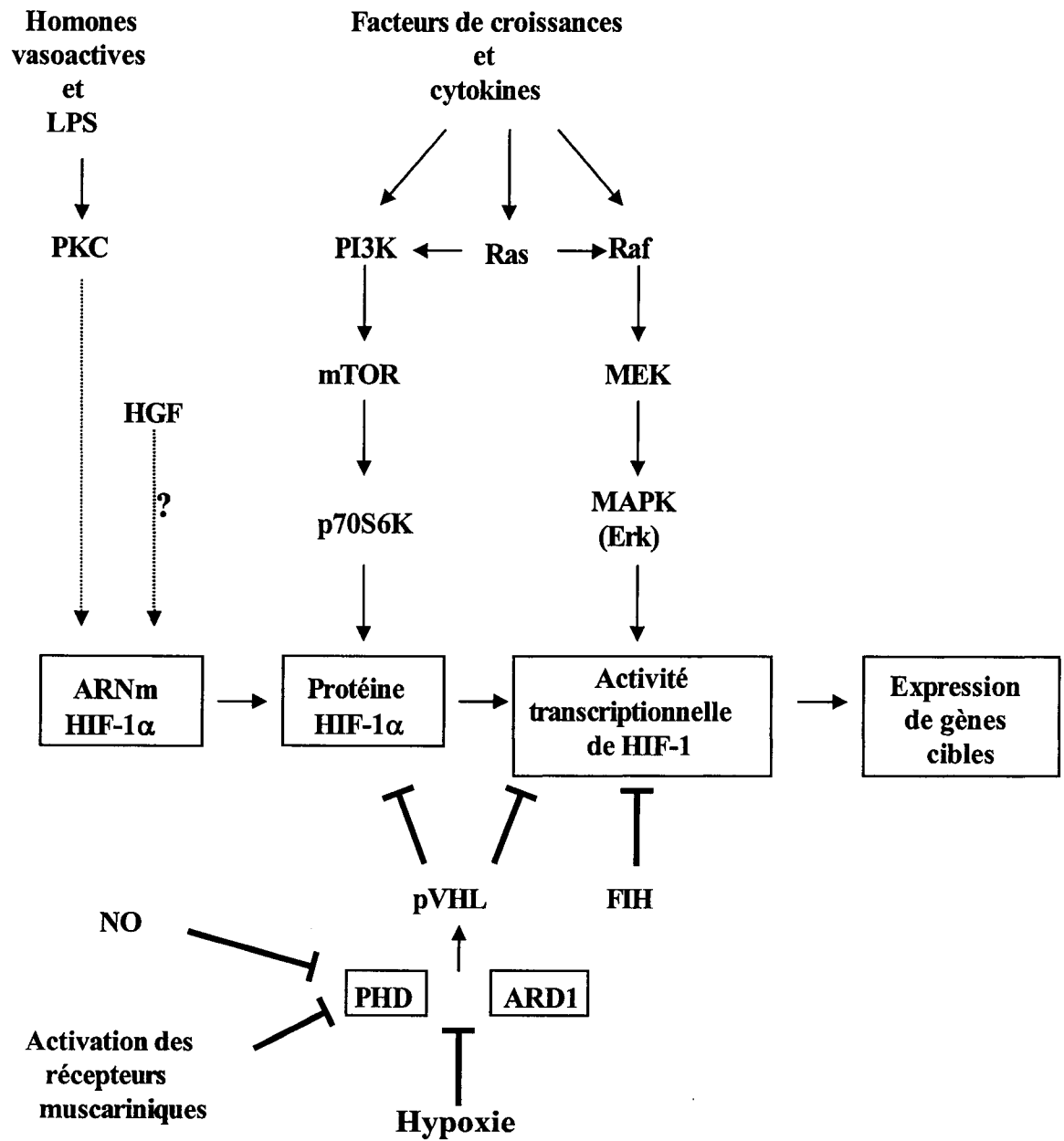
HIF-1 $\alpha$ . Des mutations qui activent certains oncogènes ou qui inactivent des suppresseurs de tumeurs peuvent également influencer l'expression du HIF-1 $\alpha$ . Par exemple, l'inactivation de PTEN, un antagoniste de la voie de signalisation PI3K, augmente l'expression de la protéine HIF-1 $\alpha$  ainsi que l'expression de gènes qui sont sous le contrôle du HIF-1 (Zundel et al., 2000). De façon similaire, la perte d'activité du suppresseur de tumeur pVHL induit la stabilisation constitutive du HIF-1 $\alpha$  (Maxwell et al., 1999). Tel que mentionné précédemment, plusieurs facteurs de croissance et cytokines retrouvés dans le microenvironnement tumoral peuvent également induire une hausse des niveaux du HIF-1 $\alpha$ . Les différentes voies menant à l'induction de l'expression et/ou de l'activité du HIF-1 sont résumées à la figure 9.

#### **2.2.4 Les rôles du HIF-1 dans la tumorigénèse.**

La tumorigénèse est une condition pathologique dans laquelle l'hypoxie joue un rôle décisif. La sous-unité régulable du HIF-1, le HIF-1 $\alpha$ , est surexprimée chez la plupart des tumeurs solides, tel que révélé par l'analyse immunohistochimique de biopsies de tumeurs humaines (Beasley et al., 2002; Bos et al., 2001; Talks et al., 2000). Cette surexpression corrèle généralement avec l'expression de VEGF, la densité vasculaire et le taux de croissance de la tumeur (Bos et al., 2001; Giatromanolaki et al., 2001; Ravi et al., 2000). Également, plusieurs travaux démontrent que chez des modèles de xénogreffes, la croissance et l'angiogenèse sont inhibées par la perte d'activité du HIF-1 et stimulées par la surexpression du HIF-1 $\alpha$ , ce qui indique que le HIF-1 contribue au processus de tumorigénèse (Jiang et al., 1997a; Kung et al., 2000; Maxwell et al., 1997; Ravi et al., 2000; Stoeltzing et al., 2004).

**Figure 9: Comparaison des diverses voies régulant l'expression et l'activité transcriptionnelle du HIF-1.** L'hypoxie induit l'expression du HIF-1 chez tous les types cellulaires en inhibant l'activité des hydroxylases PHD et en réprimant l'expression de l'acétyltransférase ARD1. Également, l'hypoxie augmente l'activité transcriptionnelle du HIF-1 en inhibant l'activité de l'hydroxylase FIH. De façon contraire, les stimuli non-hypoxiques ont des effets spécifiques sur l'expression et l'activité du HIF-1 en empruntant différentes voies de signalisation. L'activation de la voie de la PKC induit la transcription du gène du HIF-1 $\alpha$ . La synthèse de la protéine HIF-1 $\alpha$  est induite via la voie de signalisation de la PI3K, tandis que l'activation de la voie des MAPK conduit à l'induction de l'activité transcriptionnelle du HIF-1. Seulement quelques stimuli non-hypoxiques (des donneurs de NO et l'activation des récepteurs muscariniques M1 et M2) agissent sur l'activité des PHD via un mécanisme qui n'est pas encore connu.

## Stimuli non-hypoxiques



Adapté de Semenza *et al.*, 2002

Le facteur de transcription HIF-1 joue un rôle central dans la progression tumorale en activant la transcription de gènes associés avec le processus d'angiogenèse, la croissance, la survie ainsi que l'acquisition d'un phénotype invasif/métastatique (voir tableau VII) (Hopfl et al., 2004; Semenza, 2003). Le VEGF est l'une des cibles du HIF-1 les plus étudiées. Ce facteur de croissance est un puissant agent pro-angiogénique qui induit la prolifération, la maturation ainsi que la mobilité des cellules endothéliales vers les régions hypoxiques de la tumeur afin de former un nouveau réseau sanguin (Ferrara, 2005). Le HIF-1 induit également l'expression d'autres molécules impliquées dans le processus d'angiogenèse et la régulation du tonus vasculaire dont le récepteur du VEGF flt-1, l'endothéline-1, l'angiopoïétine-2, la synthase d'oxyde nitrique inducible (iNOS) ainsi que l'adrénomédulline (Forsythe et al., 1996; Garayoa et al., 2000; Jung et al., 2000; Melillo et al., 1997; Yamakawa et al., 2003; Yamashita et al., 2001).

L'absence d'oxygène induit également des voies métaboliques telles que la glycolyse afin de permettre la production d'énergie nécessaire au maintien des fonctions cellulaires. Presque toutes les enzymes de la voie glycolytique ainsi que les transporteurs nécessaires à la prise du glucose sont sous le contrôle du HIF-1 (Iyer et al., 1998; Wenger, 2000). La prolifération des cellules tumorales peut aussi être modulée par des facteurs de croissances, tels que le facteur de croissance similaire à l'insuline de type 2 (IGF-2), dont l'expression est directement ciblée par le HIF-1 (Feldser et al., 1999). Le HIF-1 peut également modifier l'expression de la transcriptase inverse de télomérase hTERT (Nishi et al., 2004). Cette observation suggère l'existence d'une nouvelle voie d'activation des télomérases dans les cellules tumorales via l'activation transcriptionnelle de hTERT. Ceci

contribuerait donc à maintenir le potentiel de réplication des cellules tumorales, tel que vu précédemment.

Un autre mécanisme régit par le HIF-1 qui permet l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie est l'apoptose. Les évidences obtenues jusqu'à maintenant indiquent que le HIF-1 peut avoir des effets pro- ou anti-apoptotique, selon le type cellulaire étudié et les conditions expérimentales utilisées. Il semblerait que des conditions sévères ou prolongées d'hypoxie favoriseraient l'apoptose via l'interaction directe du HIF-1 $\alpha$  avec le p53, ce qui induit la stabilisation du p53 et l'induction de gènes qui régulent le cycle cellulaire, tel que le p21 (Carmeliet et al., 1998). D'autre part, une récente publication indique que le HIF-1 induit, chez plusieurs lignées tumorales cultivées en hypoxie, l'expression de nucleophosmine, un inhibiteur du p53, ce qui permet le maintien de la survie cellulaire (Li et al., 2004).

Les processus dynamiques au sein de la matrice extracellulaire peuvent aussi être influencés par le HIF-1. L'expression de protéines impliquées dans l'invasion des cellules endothéliales lors du processus d'angiogenèse, mais également dans l'invasion et la formation de métastases par les cellules tumorales est modifiée par le HIF-1. Parmi celles-ci, on retrouve la métalloprotéinase de la matrice de type 2 (MMP-2), la cathepsine D, le récepteur activateur de la plasminogène urokinase (UPAR), l'inhibiteur de l'activateur de plasminogène (PAI-1) et les kératines 14/18/19 (Kietzmann et al., 1999; Krishnamachary et al., 2003). Ainsi, le HIF-1 contrôle plusieurs aspects de la biologie du cancer via l'expression de nombreux gènes dont la liste ne cesse de s'accroître.

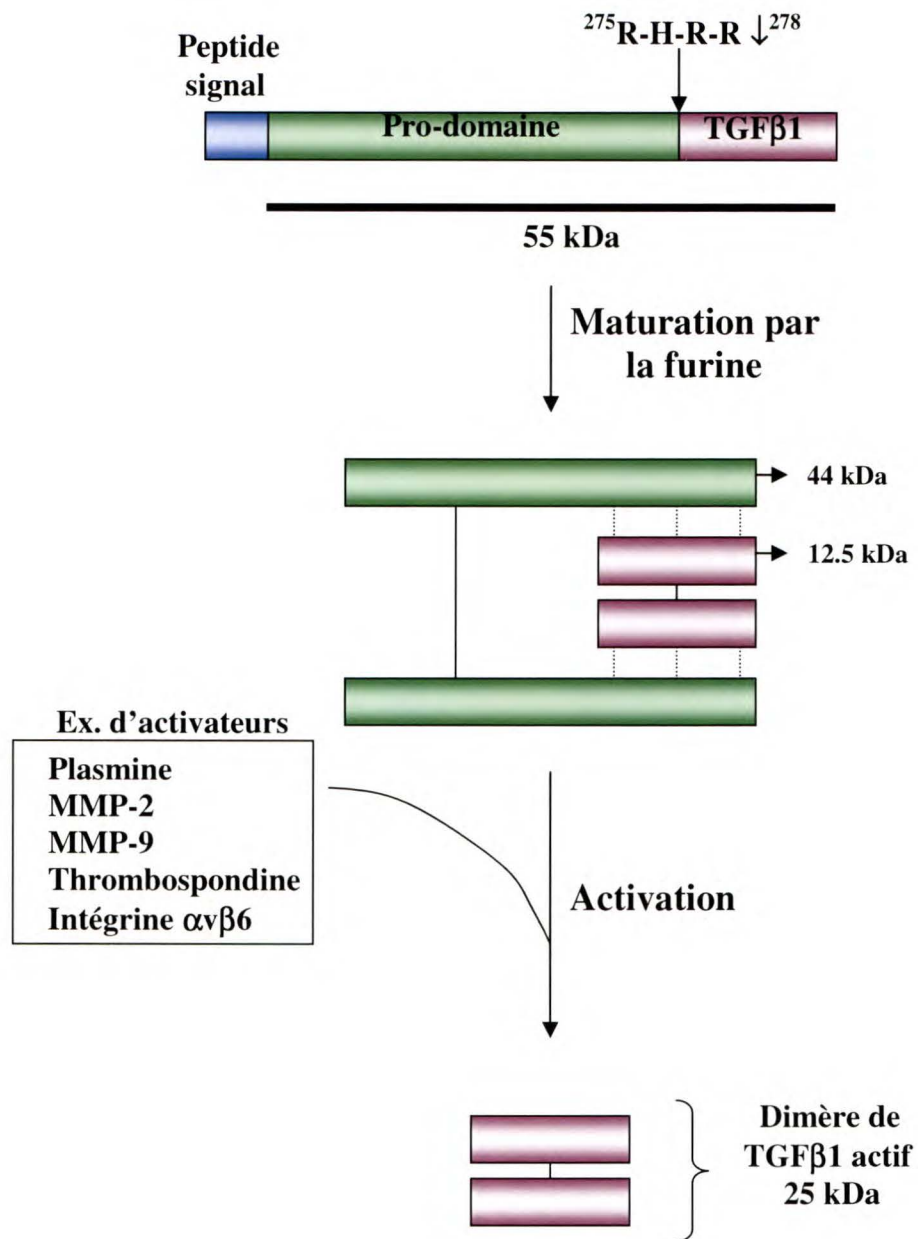


### **2.3 Le facteur de croissance TGFβ1.**

Lors du processus de progression tumorale, de nombreux changements sont observés dans le microenvironnement des tumeurs. Au cours de leur croissance, les tumeurs produisent un large éventail de facteurs pro-tumorigéniques. La surexpression de TGFβ est une caractéristique commune à plusieurs types de cancer (Pasche, 2001). Chez les mammifères, il existe trois formes de TGFβ, soit le TGFβ1, β2 et β3, qui sont encodées par des gènes différents, mais dont les fonctions se manifestent via le même système de signalisation (Derynck et al., 1985; Derynck et al., 1988; Madisen et al., 1988; Massague, 1998; Roberts et al., 1991). Parmi ces formes de TGFβ, le TGFβ1 est le plus fréquemment surexprimé par les cellules tumorales et par les cellules inflammatoires (Derynck et al., 1987; Pasche, 2001) telles que les macrophages associés aux tumeurs qui participent, par le biais de la libération de facteurs pro-tumorigéniques, à la croissance tumorale, à l'angiogenèse et à la formation de métastases (Lin and Pollard, 2004; Mantovani et al., 2004).

#### **2.3.1 L'activation du TGFβ1.**

Tel qu'illustré à la figure 10, le TGFβ1 est synthétisé initialement sous la forme d'un précurseur protéique inactif (un dimère de 110 kDa). La molécule précurseuse doit être clivée à un site de reconnaissance furine afin de permettre le relâchement de la forme biologiquement active consistant en un dimère de 25 kDa (Assoian et al., 1983; Miyazono et al., 1991). Ce dimère est maintenu sous une forme latente par la liaison non-covalente du prosegment (Miller et al., 1992; Munger et al., 1997). Il a été démontré précédemment



**Figure 10: Maturation et activation du pro-TGFβ1.** La forme bioactive du TGFβ1 est issue du clivage du pro-domaine par la furine suivant le site R-H-R-R↓. Le TGFβ1 mature est ensuite sécrété sous la forme d'un dimère latent lié de façon non-covalente aux pro-segments. Le relâchement des pro-segments à l'aide de protéases ou de molécules de la matrice extracellulaire induit la libération de la forme active de 25 kDa du TGFβ1.

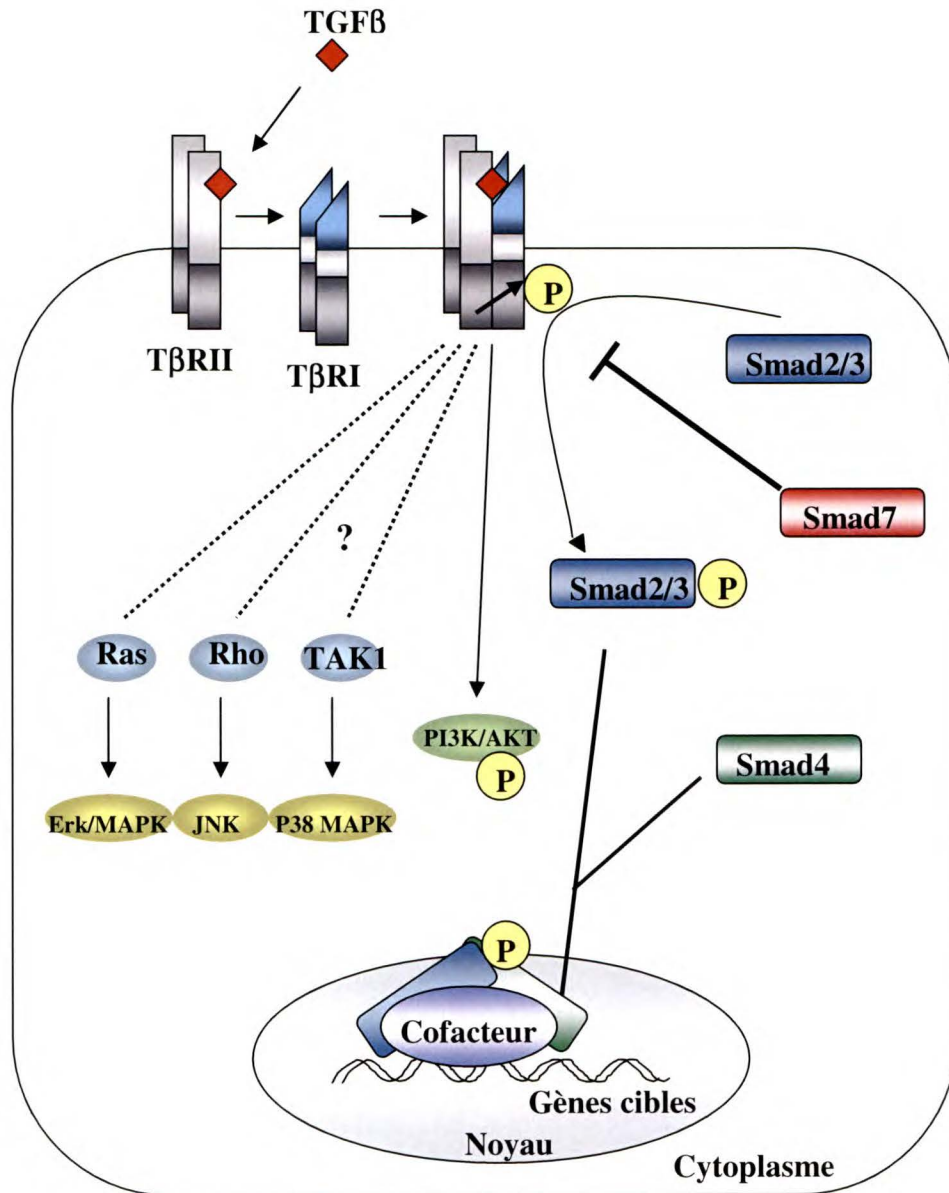
au laboratoire que la furine est la convertase principalement responsable de la maturation de TGF $\beta$ 1 (Dubois et al., 2001; Dubois et al., 1995). Des travaux ont également révélé que le TGF $\beta$ 1 a la capacité d'augmenter les niveaux de transcription du gène encodant pour son enzyme de conversion, créant ainsi une boucle de régulation positive (Blanchette et al., 1997; Blanchette et al., 2001b). La sécrétion du TGF $\beta$ 1 sous la forme d'un complexe latent évoque l'existence d'un processus d'activation. Celui-ci implique des protéases fréquemment exprimées par les cellules malignes qui dégradent les prosegments et libèrent le dimère actif du TGF $\beta$ 1. La forme latente du TGF $\beta$ 1 peut donc être activée par les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 ainsi que la plasmine (Karsdal et al., 2002; Lyons et al., 1990; Sato and Rifkin, 1989; Yu and Stamenkovic, 2000). D'autres mécanismes d'activation indépendants des protéases ont été mis en évidence. Par exemple, les protéines de la matrice extracellulaire thrombospondine et l'intégrine  $\alpha$ v $\beta$ 6, qui sont exprimées à la surface des cellules épithéliales en réponse à l'inflammation, peuvent induire l'activation du TGF $\beta$  via un changement conformationnel (Crawford et al., 1998; Munger et al., 1999; Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich, 1993). Ainsi, différents mécanismes peuvent influencer l'activation du TGF $\beta$  dans différents contextes physiologiques et les tumeurs sont particulièrement bien outillées pour activer localement le TGF $\beta$ .

### **2.3.2 La signalisation par le TGF $\beta$ 1.**

Sous sa forme active, le TGF $\beta$  se lie à un complexe hétérodimérique de récepteurs transmembranaires formés des récepteurs de type I et de type II (T $\beta$ RI et T $\beta$ RII) (figure

11) (Massague and Like, 1985). Suite à la liaison du TGF $\beta$ 1, le T $\beta$ RII phosphoryle le T $\beta$ RI (Wrana et al., 1994). Cette phosphorylation induit l'activité sérine/thréonine kinase du T $\beta$ RI, qui phosphoryle subséquemment des protéines effectrices cibles. Parmi ces molécules de signalisation, les protéines Smad sont activées chez toutes les cellules sensibles à l'action du TGF $\beta$  et jouent un rôle central dans la manifestation des activités biologiques induites par ce facteur de croissance (Derynck and Zhang, 2003; Zhang et al., 1996). Les protéines Smad peuvent être subdivisées en trois sous-types, soit les Smad dont l'activité est gouvernée par le récepteur (R-Smad), les Smad partenaires (Co-Smad) ainsi que les Smad inhibiteurs (I-Smad). Lors des événements de signalisation en réponse au TGF $\beta$ , les Smad2 et 3 jouent le rôle de R-Smad, le Smad4 a la fonction de Co-Smad et le Smad7 fonctionne en tant que I-Smad (Hayashi et al., 1997; Nakao et al., 1997). Les Smad2 et 3 sont activés via leur phosphorylation par le T $\beta$ RI et forment des complexes hétérotrimériques avec le Smad4. Ces complexes sont ensuite transloqués au noyau des cellules et où ils agissent, avec l'aide de partenaires tels que l'AP-1 ou le Fast-1, en tant qu'activateurs transcriptionnels de gènes cible (Liberati et al., 1999; Zhou et al., 1998). De façon contraire, le Smad7 interfère avec l'activation des Smad effecteurs en se liant directement au T $\beta$ RI, ce qui prévient la phosphorylation des R-Smad. Le récepteur T $\beta$ RI peut également induire l'activation d'autres voies de signalisation telles que celles des MAPK Erk et p38 ainsi que la voie de la PI3K (Bakin et al., 2000; Mulder, 2000). Des évidences récentes indiquent que le récepteur de type I s'associe de façon indirecte avec la protéine p85 et la phosphoryle, ce qui induit l'activation de la voie de la PI3K (Yi et al., 2005). Toutefois, les mécanismes par lesquels le T $\beta$ RI active les différentes voies de signalisation des MAPK demeurent inconnus.

**Figure 11: Représentation des voies de signalisation induites par le TGFβ1.** Le TGFβ transmet son signal via un complexe hétéro-tétramérique formé des récepteurs TβRI et TβRII. La liaison du TGFβ induit la transphosphorylation et l'activation du domaine sérine/thréonine kinase du récepteur de type I par le récepteur de type II. Les R-Smads (Smad2 et 3), qui sont phosphorylés par le TβRI, forment un complexe avec le Smad4 et transloquent au noyau où ils induisent l'expression de gènes cibles avec l'aide d'autres facteurs de transcription qui jouent le rôle de cofacteurs (ex : AP-1, Fast-1, p300/CBP). À part la voie des Smads, d'autres voies de signalisation sont directement ou indirectement activées par le TGFβ, incluant les voies des MAPK Erk, JNK et p38 ainsi que la voie de signalisation de la PI3K.

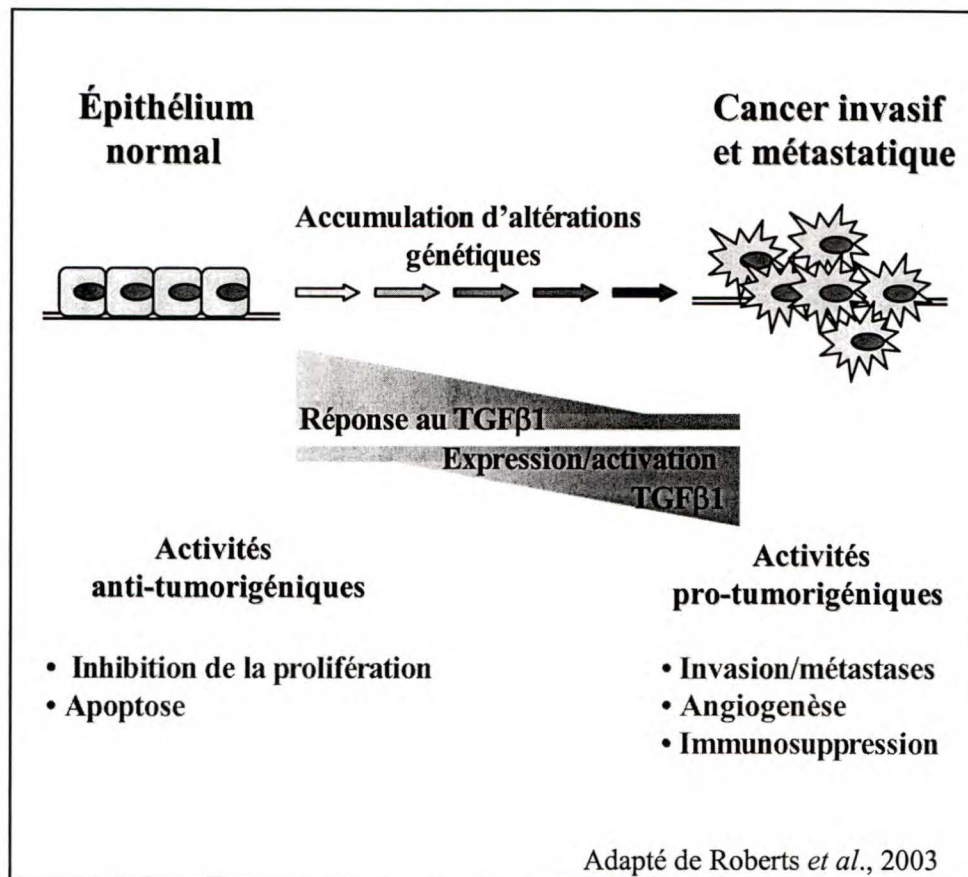


Adapté de Hata *et al.*, 2001 et Derynck *et al.*, 2003

### 2.3.3 Les rôles du TGFβ1 dans la tumorigenèse.

Le TGFβ1 fut d'abord découvert et nommé facteur de transformation grâce à sa capacité à induire un comportement malin chez des fibroblastes normaux (Roberts et al., 1980). À l'époque, cette fonction était toutefois difficile à réconcilier avec son patron d'expression ubiquiste, incluant sa prévalence chez les plaquettes (Moses et al., 1987). Paradoxalement, quelques années plus tard, des études ont souligné la capacité du TGFβ à supprimer la prolifération de plusieurs types cellulaires, incluant les cellules épithéliales et lymphoïdes, qui sont à la base de la majorité des cancers humains (Roberts et al., 1985). À partir des évidences *in vitro* et *in vivo* accumulées jusqu'à maintenant, on attribue au TGFβ1 des rôles antagonistes dans le développement tumoral. Dans les étapes précoces de la carcinogenèse, le TGFβ a un effet inhibiteur de la croissance cellulaire qui est dépendant de l'intégrité des voies de signalisation. Dans les stades plus tardifs, le TGFβ1, dont l'expression et l'activation sont augmentées dans de nombreux cancers, favorise le développement tumoral. Il induit la croissance tumorale et la formation de métastases via la combinaison d'effets permissifs sur les tissus stromaux, l'angiogenèse et le système immunitaire (figure 12) (Bachman and Park, 2005; Roberts and Wakefield, 2003).

L'effet inhibiteur du TGFβ1 sur la prolifération cellulaire serait imputable, du moins *in vitro*, à sa capacité à supprimer l'expression de c-myc et à augmenter l'expression des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CDK) p15<sup>INK4b</sup>, p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>Kip1</sup> (Datto et al., 1995; Hannon and Beach, 1994; Mulder et al., 1990; Reynisdottir et al., 1995). De plus, il a été démontré que le TGFβ peut induire l'apoptose chez divers types cellulaires.



**Figure 12: Rôles du TGFβ1 dans la carcinogenèse.** Les effets suppresseurs de tumeur du TGFβ1 dans les stades précoces du développement tumoral sont convertis en effets pro-tumorigéniques dans les étapes les plus avancées de la maladie, menant à la formation de métastases. La progression tumorale est généralement accompagnée par une diminution ou une altération de la réponse au TGFβ1, ainsi que par l'augmentation de l'expression et/ou de l'activation du ligand TGFβ1. Ces perturbations, en combinaison avec d'autres changements génétiques ou épigénétiques, occasionnent des modifications aux effets biologiques induits par le TGFβ1.



L'augmentation des niveaux des Smad3 et 4 induit l'apoptose tandis que le Smad7 peut agir en tant qu'agent protecteur de la mort cellulaire (Dai et al., 1999; Patil et al., 2000; Yanagisawa et al., 1998). Bien que les Smad soient impliqués dans l'apoptose induite par le TGF $\beta$ 1, les gènes pro-apoptotiques ciblés par ces médiateurs restent à être identifiés.

Dans les stades plus avancés de la tumorigenèse, les tumeurs acquièrent généralement une résistance aux effets suppresseurs de tumeurs du TGF $\beta$  via des altérations au niveau des médiateurs de la réponse à ce facteur de croissance. Par exemple, l'inhibition de la voie des Smad suite à l'activation des voies de signalisation PI3K et Raf, par le TGF $\beta$  et/ou des facteurs de croissances retrouvés en abondance dans le microenvironnement des tumeurs en progression (ex : EGF), protège contre les effets pro-apoptotiques et anti-prolifératifs du TGF $\beta$  (Chen et al., 1998; Huggett et al., 1990; Lehmann et al., 2000). Diverses observations indiquent également que les récepteurs du TGF $\beta$  sont souvent exprimés à la baisse chez les cellules tumorales, ce qui leur permet d'échapper aux effets inhibiteurs du TGF $\beta$  (Eisma et al., 1996; Franchi et al., 2001; Matsushita et al., 1999). Dans quelques rares cas, des mutations qui inhibent complètement l'activité de ces récepteurs ont été signalées (ex : cancer du colon) (Chen et al., 2001b; Montgomery et al., 2001). Des mutations qui inactivent des éléments de la voie de transduction du signal en réponse au TGF $\beta$  ont également été répertoriées. Dans la carcinogenèse pancréatique, la mutation de la protéine Smad4 est un événement bien documenté. En fait, dans plus de 90% des cas, une perte d'hétérozygosity est observée dans la région 18q21, le locus qui encode le gène de Smad4. Des travaux réalisés avec des souris hétérozygotes pour l'expression de Smad4 (+/-) indiquent que cette haploinsuffisance confère un avantage

prolifératif aux cellules pancréatiques et permet l'initiation de la formation de tumeurs (Xu et al., 2000). Cependant, bien que des mutations dans les gènes encodant les Smad2 et 4 ait aussi été détectées chez d'autres types de carcinomes, elles sont tout de même qualifiées d'événements marginaux (Fukushima et al., 2003; Salovaara et al., 2002). Ainsi, la signalisation en réponse au TGF $\beta$  serait atténuée par des altérations qui n'abolissent généralement pas de façon complète la capacité des cellules à répondre à ce facteur de croissance.

Bien que les événements moléculaires permettant la transition entre les effets anti et pro-tumorigéniques du TGF $\beta$  ne soient pas encore très bien compris, il est clair que le TGF $\beta$ 1 confère un avantage sélectif au développement des tumeurs et à la formation de métastases. D'abord, le TGF $\beta$ 1 est un puissant facteur pro-angiogénique, tel que démontré dans plusieurs essais *in vitro* et modèles de souris ayant des déficiences dans certains éléments de la voie de signalisation du TGF $\beta$ . Par exemple, l'inactivation des gènes encodant le T $\beta$ RI ou T $\beta$ RII engendre la mort embryonnaire due à des défauts vasculaires et angiogéniques (Larsson et al., 2001; Oshima et al., 1996). Plusieurs modèles démontrent également que le TGF $\beta$ 1 joue un rôle dans l'angiogenèse tumorale. La surexpression du TGF $\beta$ 1 par des cellules humaines de carcinome de la prostate entraîne une augmentation de l'angiogenèse tumorale lors d'essais de xénogreffes chez des souris immuno-déficientes, tandis que l'administration locale d'anticorps anti-TGF $\beta$  neutralisants réduit la formation de vaisseaux sanguins chez les tumeurs (Stearns et al., 1999; Ueki et al., 1992). L'effet pro-angiogénique du TGF $\beta$ 1 a été associé à sa capacité à induire l'expression de VEGF (Saito et al., 1999). Le TGF $\beta$  stimule également de façon

indirecte l'angiogenèse grâce à son activité de chimioattraction des cellules monocytaires qui sécrètent des cytokines pro-angiogéniques (Ashcroft, 1999; Lin and Pollard, 2004).

Le TGF $\beta$ 1 induit des changements dans le microenvironnement des tumeurs, ce qui crée des conditions optimales pour l'établissement d'un nouveau réseau vasculaire intra-tumorale ainsi que pour l'invasion et la formation de métastases. Entre autres, le TGF $\beta$ 1 induit l'expression de métalloprotéinases telles que la MMP-2 et la MMP-9 et réprime l'expression d'inhibiteurs de ces protéases, les TIMP, chez les cellules tumorales et endothéliales (Duivenvoorden et al., 1999; Hagedorn et al., 2001; Sehgal and Thompson, 1999). Ceci contribue à l'invasion des cellules endothéliales qui est requise pour le processus d'angiogenèse ainsi qu'à la migration des cellules tumorales à travers le stroma et la membrane basale des vaisseaux sanguins, ce qui favorise la formation de métastases. L'équipe du Dr Arteaga a récemment mis en évidence l'effet pro-tumorigénique du TGF $\beta$ 1 chez des tumeurs déjà établies (Muraoka-Cook et al., 2004). Un modèle d'expression conditionnelle du TGF $\beta$ 1 sous le contrôle d'un promoteur induit par la doxycycline a permis de démontrer que l'expression du TGF $\beta$ 1 occasionne une augmentation de dix fois le nombre de métastases formées. À l'inverse, l'inhibition du TGF $\beta$ 1 a réduit la mobilité, la survie, la tumorigénicité ainsi que la formation de métastases, indiquant que l'induction et/ou l'activation du TGF $\beta$ 1 par des tumeurs pré-établies peut accélérer la progression métastatique.

Plusieurs observations révèlent également que l'expression du TGF $\beta$ 1 par les cellules tumorales réprime l'immunosurveillance, ce qui favorise la croissance tumorale. Le

TGF $\beta$ 1 inhibe les fonctions immunes des lymphocytes B et T, des cellules NK, des neutrophiles et des macrophages (Ashcroft, 1999; Fortunel et al., 2000; Letterio and Roberts, 1998). Plus particulièrement, l'expression du TGF $\beta$ 1 par les cellules tumorales prévient l'activation locale des lymphocytes T cytotoxiques. Cette répression corrèle avec une diminution de l'expression de l'IL-2 et du récepteur à l'IL-2 (Kehrl et al., 1986a; Kehrl et al., 1986b).

## **2.4 Les métalloprotéinases**

### **2.4.1 La structure des MMP.**

Les métalloprotéinases de la matrice (MMP) appartiennent à la famille de protéases de type matrixine. Elles consistent en un groupe d'endopeptidases dépendantes du zinc qui jouent un rôle clé dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) associée à l'invasion des cellules tumorales, à la formation de métastases et à l'angiogenèse (Egeblad and Werb, 2002; McCawley and Matrisian, 2000). La première métalloprotéinase de mammifère, soit la MMP-1, a été découverte il y a plus de 30 ans par Gross et Lapiere chez les tissus d'amphibiens (Gross and Lapiere, 1962). Depuis, 28 MMP ont été identifiées chez les vertébrés, dont 21 sont exprimées chez les humains (Egeblad and Werb, 2002). La famille des MMP peut être divisée en 2 grands groupes, soit les MMP de type soluble ou membranaire. Bien que classifiées initialement en fonction de leur spécificité de substrats (McCawley and Matrisian, 2000), la classification des MMP repose maintenant sur leur structure (figure 13) (Egeblad and Werb, 2002). La

première classe appelée « MMP formées des domaines minimaux » comprend les MMP-7 et MMP-26 qui contiennent (i) un peptide signal qui les dirige au réticulum endoplasmique en vue de la sécrétion, (ii) un propeptide possédant un groupement thiol (SH) qui interagit avec les molécules de zinc associées à la région catalytique afin de maintenir la pro-MMP sous une forme de zymogène (latente) et (iii) un domaine catalytique contenant un site de liaison pour le zinc hautement conservé (HEXGHXXGXXHS/T). À l'exception de la MMP-23, toutes les MMP possèdent une région charnière (*hinge region*) qui relie le domaine catalytique au domaine hémapexin. Ce dernier, situé dans la région C-terminale, influence la spécificité de substrats et la liaison des inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMP). Les MMP arborant un domaine hémapexin se distinguent également par la présence d'autres structures qui leur sont spécifiques. Les MMP-2 et 9 (appelées respectivement gélatinases A et B) sont capables de lier la gélatine grâce à un insert qui ressemble à la séquence de liaison au collagène retrouvée chez la fibronectine. Quant aux métalloprotéinases de type membranaire (MT-MMP), elles ont soit un domaine transmembranaire à un seul passage suivi d'une courte queue cytoplasmique ou une région hydrophobique qui agit en tant que signal d'ancrage pour le glycosyl phosphatidylinositol (GPI). Un motif de reconnaissance pour la furine est inséré entre les domaines pro et catalytique de plusieurs MMP dont les protéases sécrétées MMP-11 (stromélysine-3) et MMP-21 ainsi que les MT-MMP. Finalement, la MMP-23 contient, à la place d'un domaine hémapexin, des domaines qui lui sont uniques dont un domaine riche en cystéines et prolines ainsi qu'un domaine ressemblant au récepteur de type II de l'IL-1 (Pei et al., 2000).

**Figure 13: Représentation schématique de la structure protéique des métalloprotéinases de mammifère.** Les MMPs sont divisées en deux groupes selon qu'elles soient sécrétées ou membranaires. Les différents domaines composant les MMPs sont représentés: Pré, peptide signal; Pro, pro-peptide; Fur, motif de reconnaissance pour la furine; Zn, site de liaison du zinc; Fi, site de liaison au collagène de type fibronectine; C, région charnière; Vn, insert de type vitronectine; TM, domaine transmembranaire; Cy, queue cytoplasmique; GPI, domaine d'ancrage glycosyl phosphatidylinositol; C/P, domaine riche en cystéines et en prolines; Type IgG, domaine de type immunoglobuline.

## I. MMPs sécrétées

### 1) MMPs formées des domaines minimaux

MMP-7/Matrilysin, MMP-26/endometase



### 2) MMPs formées d'un simple domaine hémapexin

MMP-1/collagénase-1, MMP-8/collagénase-2, MMP-13/collagénase-3, MMP-1/collagénase-4, MMP-3/stromélysine-1, MMP-10/stromélysine-2, MMP-27, MMP-12/métalloélastase, MMP-19/RASI-1, MMP-20/enamélysine, MMP-22



### 3) MMPs liant la gélatine

MMP-2/gélatinase A, MMP-9/gélatinase B



### 4) MMPs sécrétées maturées par la furine

MMP-11/Stromélysine-3, MMP-28/épyline



### 5) MMPs ayant un insert vitronectine

MMP-21/homologue de la XMMP de *Xenopus*



## II. MMPs membranaires

### 6) MMPs ayant un domaine transmembranaire

MMP-14/MT1-MMP, MMP-15/MT2-MMP, MMP-16/MT3-MMP, MMP-24/MT5-MMP



### 7) MMPs ancré via un GPI

MMP-17/MT4-MMP, MMP-25/MT6-MMP



### 8) MMPs membranaire de type II

MMP-23/MMP à domaine riche en cystéines



Adapté de Sounni *et al.*, 2003

#### **2.4.2 L'activation des MMP.**

Les membres de la famille des MMP partagent des caractéristiques communes quant à leur activité : (1) chacune des MMP est capable de dégrader au moins une composante de la MEC, (2) elles sont actives à un pH physiologique, (3) elles requièrent 2 molécules de  $Zn^{++}$  pour leur activité, (4) elles sont inhibées par des chélateurs de métaux ainsi que les TIMP et (5) elles sont secrétées sous la forme de zymogènes qui requièrent une activation protéolytique (John and Tuszynski, 2001). De façon endogène, la régulation de l'activité des MMP se fait à trois niveaux, incluant l'expression des gènes encodant les MMP, l'activation des zymogènes latents et l'inhibition par les TIMP. L'effet coopératif de ces trois facteurs permet un contrôle rigoureux de l'activité des MMP en contexte physiologique, alors que des altérations à chacun de ces niveaux de contrôle sont associées à la progression tumorale (Celentano and Frishman, 1997).

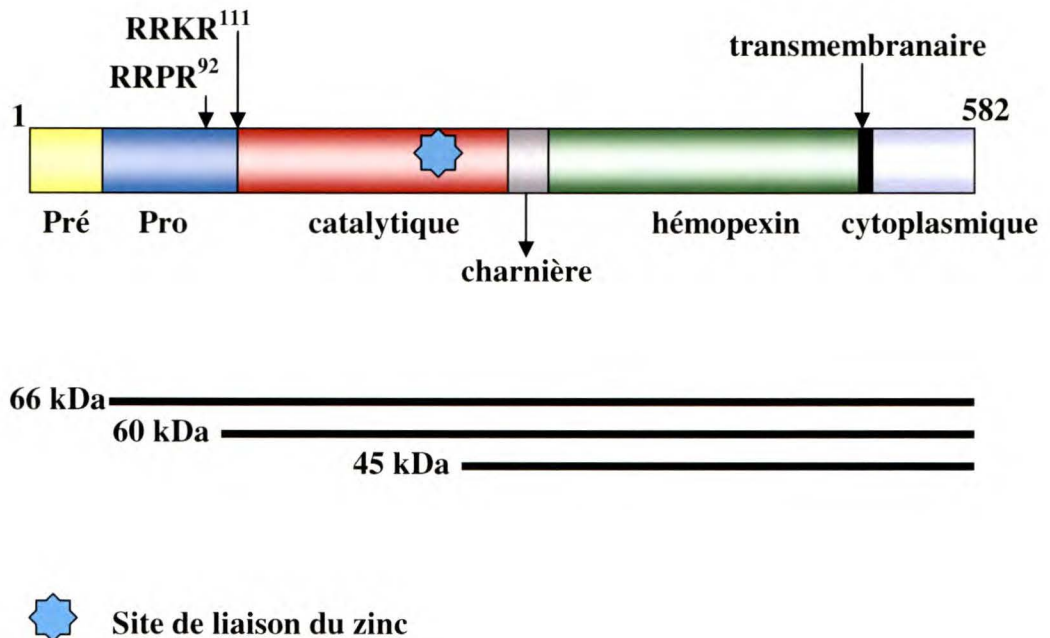
D'abord, l'expression génique des MMP et des TIMP est sous le contrôle d'une variété de cytokines, de facteurs de croissance, d'hormones stéroïdiennes et de phorbol esters (Chakraborti et al., 2003; Parsons et al., 1997). Cependant, les mécanismes d'activation transcriptionnelle des MMP par ces facteurs ne sont pas encore bien élucidés puisqu'ils induisent des patrons d'expression variables chez différentes cellules et tissus et ont également des effets variables en conditions physiologiques et pathologiques. L'une des familles d'inducteurs ayant les effets les plus puissants sont les phorbol esters tel que le PMA (Toth et al., 1997). D'autres facteurs impliqués dans la stimulation de l'expression des MMP sont l'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , l'IL-8, le TGF $\beta$ 1, le TNF $\alpha$ , le bFGF, VEGF et le EGF (Chakraborti et al., 2003; Kanno et al., 1998; Lamoreaux et al., 1998; Miyake et al., 1997;



Parsons et al., 1997). À titre d'exemple, il est connu que le TGF $\beta$ 1 stimule l'expression de la MMP-2 chez une variété de cellules tumorales incluant des cancers de l'ovaire, du pancréas, de la peau, du cerveau et des os (Brown et al., 1990; Duivenvoorden et al., 1999; Ellenrieder et al., 2001; Lin et al., 2000; Sehgal and Thompson, 1999). Afin de créer un milieu propice à l'invasion, une balance entre les niveaux de protéases et d'inhibiteurs doit exister. Bien que le rôle exact des cytokines et des facteurs de croissance ne soit pas clairement compris, il semble qu'ils agissent de pair afin de moduler les niveaux de MMP et de TIMP et ainsi créer un environnement favorable au déroulement de processus physiologiques ou pathologiques.

L'activation des MMP, qui sont d'abord synthétisées sous la forme de zymogènes, constitue un autre niveau de régulation. Les enzymes activées par un clivage de type furine possèdent un motif de reconnaissance pour cette convertase entre leur pro- domaine et leur domaine catalytique. Ces MMP sont clivées de façon intracellulaire par des convertases telles que la furine ou la PACE4, ce qui induit la libération de leurs formes actives (voir figure 13). La stromélysine-3 (MMP-11) est la première MMP identifiée en tant que substrats des convertases de type furine (Pei and Weiss, 1995). Par la suite, la MT1-MMP s'est aussi révélée être un substrat de ces protéases (Sato et al., 1996). Des expériences de mutagenèse dirigée ont démontré que les deux motifs de reconnaissance furine contenus dans la MT1-MMP sont efficacement clivés par cette convertase (figure 14) (Yana and Weiss, 2000). Cependant, des études ont révélé que l'activation de la MT1-MMP par la furine serait dépendante du type cellulaire étudié et que des protéases de type MMP et/ou une boucle autocatalytique pourraient participer à l'activation de la MT1-

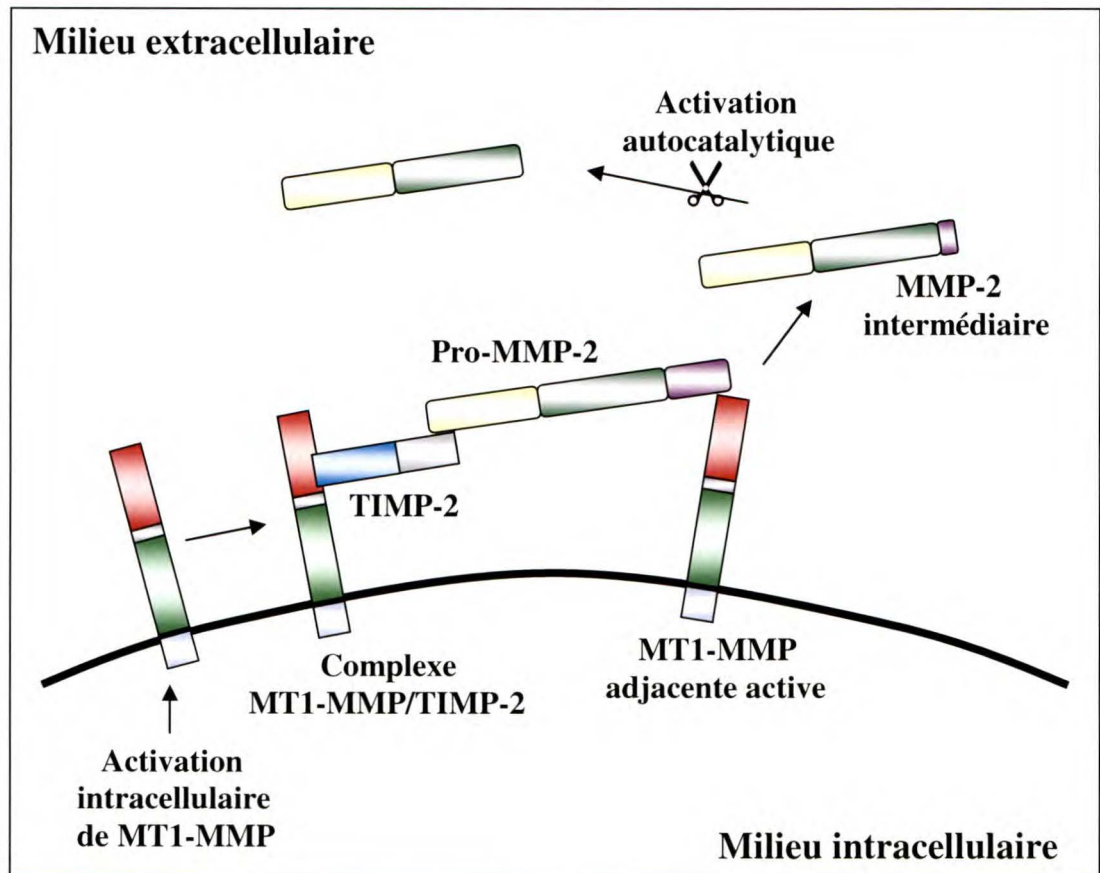
### Pro-MT1-MMP humaine



**Figure 14: Représentation de la structure du précurseur de la métalloprotéinase MT1-MMP humaine.** Les différents domaines de la MT1-MMP sont représentés. La forme latente de la MT1-MMP de 66 kDa est activée de façon intracellulaire suivant le retrait du pro-domaine, ce qui donne lieu à la sécrétion de la forme active de 60 kDa. Deux sites de reconnaissance de type furine Arg-Arg-Pro-Arg<sup>92</sup>↓ et Arg-Arg-Lys-Arg<sup>111</sup>↓ sont retrouvés à la jonction entre la pro-région et le domaine catalytique de la MT1-MMP. Ces deux motifs sont efficacement clivés par la furine. La forme mature de 60 kDa peut être subséquentement clivée par autocatalyse en une forme inactive de 45 kDa.

MMP (Sato et al., 1999; Yana and Weiss, 2000). La MT3-MMP est également un substrat de la furine et la mutation du résidu arginine pour une alanine à la position P1 du site de clivage a engendré une perte complète de l'activation de cette MMP (Kang et al., 2002). Plus récemment, il a été démontré que l'activation des MMP-28 et MT5-MMP est efficacement bloquée par un inhibiteur synthétique de la furine (peptidyl-CMK), ce qui indique que ces deux protéases sont des substrats potentiels de la furine (Illman et al., 2003; Wang and Pei, 2001).

Les MMP dépourvues de motifs de reconnaissance furine sont activées de façon extracellulaire. Ces MMP sont maintenues dans le cytoplasme sous une forme inactive via une interaction entre une cystéine contenue dans la pro-région et les ions de zinc associés au site catalytique (Springman et al., 1990). Cette interaction bloque l'accès des substrats au site actif de la MMP et le retrait de la pro-région par clivage endoprotéolytique confère l'activité à l'enzyme. Cette tâche peut-être accomplie par des protéases de type sérine mais aussi par d'autres MMP qui, une fois activées, acquièrent la capacité de s'activer entre elles (Nagase and Woessner, 1999). L'un des meilleurs exemples est l'activation de la pro-MMP2 par la MT1-MMP. Paradoxalement, cette activation requiert la participation d'un inhibiteur des métalloprotéinases, soit le TIMP-2 (Shofuda et al., 1998). Tel que démontré à la figure 15, le mécanisme d'activation est initié par la liaison de la partie N-terminale de l'inhibiteur au site actif de la MT1-MMP. Le domaine carboxy-terminal libre du TIMP2 interagit avec le domaine hemopexin de la pro-MMP-2, formant ainsi un complexe ternaire inactif à la surface cellulaire (Sternlicht and Werb, 2001). Une molécule adjacente et libre de MT1-MMP est ensuite recrutée et clive la pro-MMP-2. À la suite de ce premier clivage, la forme intermédiaire de la MMP-2, contenant une portion



Adapté de Sounni *et al.*, 2003

**Figure 15: Représentation schématique de l'activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP.** La pro-MT1-MMP peut d'abord être clivée de façon intracellulaire par la furine. La molécule TIMP-2 vient ensuite servir de molécule adaptatrice qui permet la liaison de la pro-MMP-2 à la MT1-MMP. Une seconde molécule de MT1-MMP libre et adjacente clive une portion de la pro-région de la pro-MMP-2, menant à la formation de la forme intermédiaire de la MMP-2. Le clivage subséquent de la MMP-2 implique une autocatalyse et entraîne la production de la forme active de la MMP-2.

résiduelle de la pro-région, est convertie en une forme pleinement active par autocatalyse (Atkinson et al., 1995; Will et al., 1996). De façon intéressante, le clivage du pro-domaine de la MT1-MMP n'est pas nécessaire à la liaison du TIMP-2 et à l'activation de la pro-MMP-2 (Cao et al., 1998).

Le troisième niveau de régulation des MMP s'effectue via l'inhibition de leur activité enzymatique. Divers agents ont des effets inhibiteurs des MMP dont l' $\alpha$ 2-macroglobuline et les TIMP (Baker et al., 2002). L' $\alpha$ 2-macroglobuline est une molécule de haut poids moléculaire qui inhibe l'activité de nombreuses protéases mais dont la taille prévient l'entrée dans l'espace tissulaire. Les molécules de TIMP sont, en revanche, beaucoup plus petites avec des poids moléculaires allant de 21 à 28,5 kDa et sont présentes à l'intérieur de divers tissus et fluides. La famille des TIMP est composée de 4 membres, soit les TIMP-1 à 4. Le domaine amino-terminal des TIMP est responsable de leur activité inhibitrice. Les TIMP forment un complexe non-covalent et de haute affinité avec les MMP, à un ratio stoïchiométrique de 1:1 (Baker et al., 2002; Lambert et al., 2004). Ainsi, la balance entre la quantité de protéases et d'inhibiteurs détermine l'activité protéolytique nette. Les TIMP sont des glycoprotéines ayant une activité anti-angiogénique. L'augmentation des niveaux d'expression des TIMP est généralement associée à une inhibition de l'invasion des cellules tumorales et de la formation de métastases (Baker et al., 2002; Greene et al., 1996). Parmi les membres de la famille des TIMP, le TIMP-4 est le plus récemment identifié (Greene et al., 1996). Contrairement aux TIMP-1,-2 et -4 qui sont sécrétés, le TIMP-3 est lié à la MEC (Blavier and DeClerck, 1997; Flenniken and Williams, 1990; Gomez et al., 1997; Leco et al., 1997; Leco et al., 1994). Également,

chacune des TIMP présente un patron d'expression différent. L'expression du TIMP-2 est répandue à travers les tissus et les organes du corps humain tandis que celle des autres TIMP est plutôt spécifique au tissu. Leur spectre d'action est également très large puisque chacun des TIMP peut inhiber plusieurs MMP différentes, et une même MMP peut être inhibée par plus d'un TIMP.

#### **2.4.3 Les rôles des MMP dans la tumorigenèse.**

Des études réalisées dans la dernière décennie ont révélé que plusieurs MMP sont fréquemment surexprimées chez différents types de cancers (Zucker and Vacirca, 2004). Tel que représenté au tableau VIII, ces MMP sont capables, en conjonction, de dégrader les diverses composantes de la MEC, i.e. collagènes, laminine, fibronectine, vitronectine, énaectine, protéoglycans et autres. Les MMP éliminent la MEC environnant la tumeur qui agit en tant que barrière à la prolifération, à l'invasion et à la formation de métastases par les cellules tumorales (Edwards and Murphy, 1998; Egeblad and Werb, 2002; Stetler-Stevenson and Yu, 2001). Les MMP sont également requises pour le processus d'angiogenèse tumorale. L'activité des collagénases de type IV (MMP-2 et -9) est essentielle à la morphogenèse et la formation d'extensions capillaires par les cellules endothéliales tandis que la MMP-1 semble importante pour la dégradation du collagène de type I (aussi appelé collagène interstitiel), le constituant prédominant de la MEC périvasculaire (Handsley and Edwards, 2005; John and Tuszynski, 2001). La MT1-MMP dégrade également le collagène de type I et contribue à la néovascularisation des tumeurs en activant la pro-MMP-2 à la surface cellulaire, facilitant ainsi la migration et l'invasion des cellules endothéliales (Seiki, 2003).

**Tableau VIII : Liste des MMP les plus fréquemment impliquées dans le cancer et leurs substrats.**

<b>Métalloprotéinase de la matrice</b>	<b>Substrats</b>
<b>MMP-1</b> (collagénase-1)	Collagènes de type I, II, III, VII, X, XI, gélatine, aggrécan, fibronectine, fibrin, fibrinogène, entactine, laminine, té nascine, vitronectine, IGFBPs, IL-1 $\beta$ , pro-TGF $\alpha$
<b>MMP-2</b> (Gélatinase A)	Gélatine, collagènes de type IV, V, I, III, VII, VIII, X, XI, aggrécan, décorine, laminine, vitronectine, fibronectine, élastine, entactine, fibrine, fibrinogène, plasminogène, té nascine, vitronectine, IGFBPs, inhibiteur de protéine a <sub>1</sub> , pro-MMP-13, pro-MMP-9, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ , pro-TNF $\alpha$
<b>MMP-3</b> (Stromélysine-1)	Perlecan, décorine, aggrécan, laminine, gélatine, collagènes de type III, IV, V, VII, IX, X, XI, élastine, entactine, fibronectine, té nascine, vitronectine, E-cadhérine, IL-1 $\beta$ , pro-TNF $\alpha$ , plasminogène, fibrine, fibrinogène, pro-MMP-9
<b>MMP-7</b> (Matrilysine)	Aggrécan, décorine, fibronectine, laminine, collagènes de type I, IV, gélatine, élastine, entactine, té nascine, fibronectine, vitronectine, fibrinogène, plasminogène, E-cadhérine, pro-TNF $\alpha$
<b>MMP-8</b> (Collagénase-2)	Collagènes de type I, II, III, aggrécan, fibrinogène, ADAM TS-1
<b>MMP-9</b> (Gélatinase B)	Gélatine, collagènes de type IV, V, XI, XIV, aggrécan, décorine, élastine, laminine, vitronectine, fibrine, fibrinogène, plasminogène, inhibiteur de protéine a <sub>1</sub> , IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$

<b>Métalloprotéinase de la matrice</b>	<b>Substrats</b>
<b>MMP-10</b> (stromélysine-2)	Aggrécan, fibronectine, laminine, gélatine, élastine, collagènes de type I, III, IV, V, IX, fibrinogène, proMMP-1, -7, -8, -9
<b>MMP-11</b> (stromélysine-3)	Inhibiteur de protéine $\alpha_1$ , laminine, fibronectine IGFBPs,
<b>MMP-12</b> (Métalloélastase)	Aggrécan, élastine, fibronectine, entactine, vitronectine, laminine, inhibiteur de protéine $\alpha_1$ , collagènes de type I, IV, gélatine, fibrinogène, plasminogène, pro-TNF $\alpha$
<b>MMP-13</b> (Collagénase-3)	Collagènes de type I, II, III, IV, VI, IX, X, gélatine, fibronectine, aggrécan, fibrinogène, proMMP-9
<b>MMP-14</b> (MT1-MMP)	Fibronectine, collagènes de type I, II, III, gélatine, entactine, fibronectine, aggrécan, perlecan, vitronectine, ténascine, fibrinogène, inhibiteur de protéine $\alpha_1$ , proMMP-2, proMMP-13, pro-TNF $\alpha$

Adapté de Zucker *et al.*, 2004



Les évidences les plus percutantes qui associent la MMP-2 au processus tumorigénique proviennent de l'étude de l'angiogenèse et de la progression tumorale chez un modèle de souris déficientes en MMP-2 (Itoh et al., 1998). Ces souris présentent une diminution de la capacité de néovascularisation tel que démontré par la méthode du sac d'air dorsal. De plus, le volume des tumeurs formées suivant l'injection intradermique de cellules tumorales chez ces souris est significativement diminué comparativement aux résultats obtenus avec des souris de type sauvage. Ces résultats indiquent donc que la production de MMP-2 par l'hôte est essentielle aux processus d'angiogenèse et de progression tumorale. Tel que mentionné précédemment, plusieurs facteurs pro-tumorigéniques tels que le VEGF et le TGF $\beta$ 1 peuvent induire l'expression de MMP (Hagedorn et al., 2001; Lamoreaux et al., 1998). Également, les MMP contribuent au développement d'un nouveau système vasculaire tumoral en libérant des facteurs pro-angiogéniques qui sont séquestrés dans la matrice extracellulaire, tel que le VEGF, le TGF $\beta$ , le bFGF, ce qui peut favoriser l'établissement d'une boucle de régulation positive (Dallas et al., 1995; Goerges and Nugent, 2004; Kanematsu et al., 2004).

La dégradation de la MEC et de la membrane basale des vaisseaux sanguins est considérée comme une étape essentielle à l'invasion et à la formation de métastases. Bien qu'il existe plusieurs types de protéases qui sont impliquées dans le processus métastatique (protéases de type sérine, aspartique, cystéine, thréonine et métalloprotéinases), une grande emphase a été mise sur les collagénases de type IV, MMP-2 et MMP-9. Le collagène de type IV est la composante structurale majeure de la membrane basale des vaisseaux sanguins et constitue la barrière principale pour l'intra- et

l'extravasation des cellules tumorales (Mercier and Ekindjian, 1990). Ainsi, de nombreuses études ont relié l'augmentation d'expression de la MMP-2 et de la MMP-9 à une augmentation de la capacité métastatique (Hanemaaijer et al., 2000; Hofmann et al., 1999). Plusieurs équipes de recherche ont caractérisé les profils enzymatiques de cellules tumorales agressives et invasives. Par exemple, la sélection de cellules ayant un phénotype de plus en plus invasif, à partir d'une lignée cellulaire pré-établie (CL1), révèle que les cellules les plus invasives expriment de grandes quantités de MMP-9. Ces cellules possèdent une capacité invasive de 4 à 6 fois supérieure à celle des cellules parentales (Chu et al., 1997). Il a également été démontré que la MMP-9 est surexprimée chez des cellules de mélanomes d'un niveau d'agressivité avancé contrairement aux cellules de mélanomes de stades précoces (MacDougall et al., 1995). La surexpression de la MMP-2 a aussi été observée chez des cellules tumorales ayant atteint un stade plus agressif (Llorens et al., 1997; Vinyals et al., 1998). Ces études ont permis d'établir la corrélation suivante, soit plus la capacité métastatique des cellules est grande, plus elles expriment de la MMP-2. Les niveaux de pro-MMP-2 versus MMP-2 active jouent un rôle déterminant dans la capacité d'invasion et de formation de métastases. L'augmentation de l'activité de la MMP-2 est positivement associée au potentiel métastatique de plusieurs types de carcinomes (Hanemaaijer et al., 2000; Hofmann et al., 1999). Des niveaux élevés d'expression de la MT1-MMP ont aussi été associés à une augmentation des niveaux d'activité de la MMP-2 chez des carcinomes du sein, cervicaux et des poumons arborant une capacité invasive et métastatique élevée (Hofmann et al., 2003; Pulyaeva et al., 1997; Shimada et al., 2000). La transfection de plusieurs lignées cellulaires humaines (fibrosarcome HT1080, carcinome du sein MCF et gliome U251.3) avec le gène de la

MT1-MMP a causé une augmentation de l'invasion et de la migration de ces cellules tumorales (Deryugina et al., 1997).

L'expression de plusieurs autres MMP est augmentée chez les tumeurs humaines (tableau VIII) (Zucker and Vacirca, 2004). Contrairement à la MMP-1, la MMP-2, la MMP-9 et la MT1-MMP dont la surexpression est associée à un grand nombre de cancers, les autres MMP ont des patrons d'expression, qui jusqu'à maintenant, semblent être spécifiques au type de cancer. À titre d'exemple, la MMP-7 est exprimée chez 90 % des adénocarcinomes de colon et est impliquée dans la progression de cancers colorectaux (Newell et al., 1994). Toutefois, encore bien peu d'informations indiquent sa participation dans la progression d'autres formes de cancer.

### 3- LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE :

La convertase de proprotéines furine est impliquée dans l'activation/maturation d'un large spectre de molécules. Une grande majorité de ces protéines, telles que des métalloprotéinases de la matrice, des facteurs de croissance et des molécules d'adhésion sont cruciales pour l'acquisition et la progression du phénotype tumorigénique ainsi que pour la formation de métastases. La surexpression de la furine a été décrite chez plusieurs cancers et lignées cellulaires tumorales humaines. Les résultats obtenus d'études utilisant différentes approches expérimentales, telles que la surexpression ou l'inhibition de cette convertase, supportent l'hypothèse voulant que la furine contribue de façon significative au processus de tumorigenèse. Toutefois, il existe peu d'informations quant au rôle exact de la furine dans les diverses étapes de la progression tumorale et en ce qui a trait aux éléments qui influencent son expression en conditions tumorigéniques.

Les objectifs de notre étude consistaient donc à étudier les mécanismes d'action qu'emprunte la furine afin de favoriser la progression tumorale ainsi que les voies impliquées dans la régulation de l'expression de cette convertase chez les cellules cancéreuses. Plus précisément, nous avons d'abord tenté d'obtenir plus d'informations sur le rôle de la furine dans le processus d'invasion tumorale en étudiant la capacité invasive, en essais *in vitro*, de lignées cellulaires soit déficientes en furine ou complémentées génétiquement afin de produire de la furine active. En second lieu, nous avons vérifié l'impact de l'hypoxie sur l'expression de la furine et la maturation de substrats pro-tumorigéniques. Nous avons également identifié les éléments contenus dans le promoteur du gène de la furine qui supportent cette régulation via le facteur de transcription HIF-1.

Finalement, nous nous sommes attardés à définir les mécanismes par lesquels le TGF $\beta$ 1, un substrat de la furine qui est présent en abondance dans le microenvironnement des tumeurs, modifie l'expression du facteur de transcription HIF-1 en normoxie.

## **CHAPITRE I**

**Rôle alternatif de la furine dans le processus d'invasion tumorale : Augmentation des  
niveaux de la MMP-2 par le TGF $\beta$ 1 bioactif.**

Stéphanie McMahon, Marie-Hélène Laprise et Claire M. Dubois

Article publié dans le journal : Experimental Cell Research, vol. 291, p.326-339, 2003

## RÉSUMÉ :

L'enzyme de conversion furine, dont la surexpression est associée à différents types de cancer, est impliquée dans la maturation de médiateurs clés participant aux différentes étapes de la tumorigenèse. Des études démontrent que la furine joue un rôle important dans le processus d'invasion tumorale via l'activation de la MT1-MMP, la métalloprotéinase responsable de l'activation de la MMP-2. Afin d'obtenir plus d'informations sur les fonctions de la furine dans ce processus, nous avons étudié la capacité d'invasion, en chambres de Boyden, des cellules humaines d'adénocarcinome de colon LoVo, une lignée cellulaire déficiente en furine active. La complémentation génétique de ces cellules avec de la furine de type sauvage a engendré une augmentation de leur capacité d'invasion qui corrèle avec leur capacité à produire de la MMP-2. L'inhibition de l'activité de la MMP-2 à l'aide d'un inhibiteur chimique à large spectre (BB-3103) ou d'anticorps neutralisant spécifiquement la MMP-2 démontre que cette métalloprotéinase sert d'intermédiaire à l'augmentation de la capacité d'invasion des cellules LoVo conférée par l'expression ectopique de furine. De façon inattendue, la complémentation génétique avec de la furine de type sauvage n'a modifié ni le patron d'expression, ni le patron d'activation de la MT1-MMP. Elle s'est plutôt traduite par la production de la forme mature/bioactive du TGF $\beta$ 1. Des analyses des différentes formes de clivage du TGF $\beta$ 1 par buvardages de type Western indiquent clairement que la maturation du TGF $\beta$ 1 requiert l'activité protéolytique de la furine. Cependant, des essais de promoteur inductible au TGF $\beta$ 1 en présence d'inhibiteurs des MMP ou de la MMP-2 exogène suggèrent que l'activation du TGF $\beta$ 1 est sous l'influence de la MMP-2. De plus, des travaux de neutralisation du TGF $\beta$ 1 à l'aide d'anticorps spécifiques ont démontré que

la capacité invasive associée à la furine repose sur la production endogène de TGF $\beta$ 1, un facteur de croissance qui agit en induisant l'expression de la MMP-2. Nos résultats démontrent donc l'existence d'un nouveau mécanisme d'action de la furine par lequel cette convertase augmente l'invasion tumorale en établissant une boucle inédite d'amplification/activation entre la MMP-2 et le TGF $\beta$ 1.

**Contribution de l'étudiante :**

En ce qui concerne les travaux contenus dans le premier chapitre de cette thèse, Stéphanie McMahon a participé activement à l'écriture de cet article sous la supervision de sa directrice de thèse. Également, l'étudiante a réalisé toutes les expériences présentées dans ce chapitre. Il est important de noter que la Dre Marie-Hélène Laprise a contribué à l'établissement des différents clones cellulaires résultant de la transfection stable des cellules LoVo.



**ALTERNATIVE PATHWAY FOR THE ROLE OF FURIN IN TUMOR CELL  
INVASION PROCESS: ENHANCED MMP-2 LEVELS THROUGH BIOACTIVE  
TGF $\beta$**

Stephanie McMahon, Marie-Hélène Laprise and Claire M. Dubois

Immunology Division  
Faculty of Medicine  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke QC, Canada  
J1H 5N4

Running Head: TGF $\beta$  in furin-enhanced invasion

Corresponding address: \* Claire M. Dubois, Ph.D.  
Immunology Division  
Faculty of Medicine  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke QC, Canada  
J1H 5N4  
Tel. : (819) 564-5289  
Fax. : (819) 564-5215  
E-mail : [Claire.M.Dubois@USherbrooke.ca](mailto:Claire.M.Dubois@USherbrooke.ca)

Key words: LoVo cells, furin, transforming growth factor  $\beta$ , tumor invasion, MMP-2, MT1-MMP.

Total number of figures: 7

Contract grant sponsors: Canadian Arthritis Society

## **ABSTRACT:**

The mammalian convertase furin plays a significant role in tumorigenesis and its overexpression was observed in a number of different cancer types. To date, however, few mechanisms of action have been described. Most of the information available concerns the invasion step and designates MT1-MMP, through the activation of MMP-2, as the bona fide substrate mediating furin activity. However, recent reports indicate furin-independent pathways for MT1-MMP activation. To gain further insights into the role of furin in the invasion process, we studied the in vitro invasive capacity of LoVo cells, a furin-deficient adenocarcinoma cell line transfected with wild-type furin. Furin complementation resulted in an increased cell invasiveness that correlated with their capacity to produce MMP-2. Chemical blockage of MMPs activity with BB-3103 or MMP-2-specific antibodies revealed that the increased invasive capacity of furin-complemented cells was mediated by MMP-2. Unexpectedly, furin complementation did not change the status of MT1-MMP expression or activation, but instead resulted in the production of mature and bioactive TGF $\beta$ 1. Western blot-analysis of TGF $\beta$ 1 fragmentation species indicated that TGF $\beta$  maturation step required furin activity, whereas results from TGF $\beta$ -inducible reporter assays in the presence of MMP inhibitors or exogenous MMP-2 suggested that the activation step was under MMP influence. In addition, blockage with TGF $\beta$  neutralizing antibodies revealed that furin-induced invasiveness was mediated by endogenous production of TGF $\beta$ . Taken together, our findings established the existence of a novel alternative/complementary pathway by which furin increases tumor cell invasion through an amplification/activation loop between MMP-2 and TGF $\beta$ .

## INTRODUCTION:

Several mechanisms are responsible for the regulation of protein activity. Proprotein convertases (PCs) confer the biological activity to many precursor molecules by endoproteolytic cleavage at the C-terminal side of paired basic amino acids (e.g., -Lys-Arg<sup>1</sup>-, -Arg-Arg<sup>1</sup>-). To date, at least seven mammalian convertases have been identified (PC1/PC3, PC2, PC4, PACE-4, furin/PACE, PC5/PC6 and PC7/LPC). Within this family, selected members exhibit a tissue-specific distribution, such as PC1, PC2, and PC4, while furin, PACE-4, PC5/PC6, and PC7 are expressed in a broad range of tissues and cell lines [for reviews, see references [1] and [2]]. The wide distribution of PCs is in accordance with their implication in a variety of physiological and pathological processes including cancer.

Elevated expression of PCs has been reported for different tumor cell lines and human cancers including neuroendocrine tumors (PC1, PC2), colon cancers (PC5), breast tumors (furin, PACE 4, PC7), head and neck tumors (furin, PACE 4), glioblastomas (furin), and lung cancers (furin, PACE 4) [3]. So far, however, only furin expression has been correlated with cancer aggressivity and therefore is proposed to have significant prognostic value [3]. In fact, in most normal tissues, furin is detected at very low levels. This suggests that the potentially deleterious effects of furin on the maintenance of cellular homeostasis under physiological conditions are avoided by very low cellular levels of expression. In breast, head and neck, and lung cancers, the expression of furin above the normal physiological level is associated with the acquisition of a more aggressive phenotype [4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10]. In particular, furin overexpression has been observed in human non-small cell lung carcinoma (NSLC) [9 and 10]. Moreover, a recent

study revealed furin mRNA in metastasizing head and neck squamous carcinoma cells (HNSCC) but not in nonmetastasizing cells [4]. In this study, *fur* mRNA levels correlated positively with invasiveness.

It is clear that the outcome of furin overexpression could be the maturation/bioavailability of many proteins that orchestrate pathological functions. Tumorigenesis is characterized by increased growth rate, local invasion, metastasis, and angiogenesis. In fact, many polypeptide growth factors and receptors involved in this multistep process possess at their activation site a furin recognition motif (R-X-K/R-R<sup>1</sup>) [11 and 12]. This is the case of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) [13], platelet-derived growth factor (PDGF) [14 and 15], and insulin-like growth factor II (IGF-II) [16], which play a pivotal role in the regulation of growth rate. Growth factor receptors such as IGF-1R were also recently defined as major contributors of tumor growth and survival [8]. E-cadherin and certain integrins known to contribute to tumor cell motility since they are responsible for cell-cell or cell-substrate interactions are also natural furin substrates [17 and 18].

Several proteases have also been identified as PCs substrates, especially members of the matrix metalloproteinases (MMPs) family such as Stromelysin-3 and MT1-MMP [19, 20 and 21]. MMPs play an instrumental role in the acquisition of an invasive phenotype, a crucial step in tumor progression since the loss of extracellular matrix (ECM) integrity permits invasion and spreading of tumor cells. Forced expression of PACE-4 in murine spindle carcinoma cells exhibits increased invasiveness concomitantly with increased Stromelysin-3 processing [22]. In a similar fashion, furin inhibition in cancer cell lines with a chemical inhibitor or by transfection of the protein inhibitor  $\alpha_1$ -antitrypsin Portland

( $\alpha_1$ -PDX) resulted in a decreased invasiveness accompanied by a decreased MT1-MMP activation [4 and 23]. This last MMP is known to participate in tumor invasiveness since it is defined as the most specific activator of MMP-2, also called gelatinase A [20, 24 and 25]. The crucial implication of MMP-2 in the invasive/metastasis process is well documented [for review, see [26]]. In many cases the metastatic potential of cancer cells correlates with the activity of this protease [27 and 28].

Previous studies designated MT1-MMP as the most significant mediator of furin action in the tumor cell invasive process [23]. However, recent reports raised controversy by indicating that MT1-MMP maturation by furin is a cell type-specific process [29 and 30]. Two different groups demonstrated that furin cleavage, at least in certain cell types, is not a prerequisite for the conversion of proMT1-MMP into the functional active enzyme [30 and 31]. Based on these observations and given the complexity of the tumor cell invasive process, the contribution of other mediators in furin mechanism of action can be hypothesized.

TGF $\beta$ 1, an authentic furin substrate [32], is a key regulator of carcinogenesis [33 and 34]. It is well established that in the early stages of tumor development, TGF $\beta$ 1 acts as a tumor suppressor by inhibiting cell growth. However, in more advanced stages, tumors not only acquire resistance to the growth inhibitory/pro-apoptotic effects of TGF $\beta$ 1 but also produce large amounts of this cytokine. TGF $\beta$ 1 creates a favorable environment for tumor establishment by repressing immune surveillance, inducing the production of angiogenic factors and, interestingly, promoting tumor cell invasion and migration. In fact, several reports demonstrated the requirement of TGF $\beta$  signaling for both induction and

maintenance of tumor invasiveness and metastasis during late-stage tumorigenesis [35]. TGF $\beta$  signaling occurs via ligand-initiated complex formation of a heteromeric serine-threonine kinase receptor complex, following which the TGF $\beta$  type I receptor (TBR-I) is phosphorylated by the constitutively active TGF $\beta$  type II receptor (TBR-II). The activated TBR-I then propagates the signal through transient interaction and phosphorylation of TGF $\beta$  pathway-restricted Smad proteins [36]. Using a soluble form of TBR-II that can sequester the tumor-secreted growth factor, Bandyopadhyay et al. [37] demonstrated in athymic nude mice that tumor incidence and metastasis potential of sTBR-II expressing breast cancer cells were significantly lower than those of the control cell lines. Using the same cell line, other investigators have shown that the expression of a dominant negative form of TBR-II receptor decreases bone metastasis whereas a dominant positive form of TBR-I has the opposite effect [38]. This further confirms that TGF $\beta$  production and signaling is required for the induction of an invasive and metastasis phenotype.

To better understand the contribution of the proprotein convertase furin in tumor cell invasiveness, we took advantage of an experimental cell model that consists of a furin knockout cell line, the LoVo cells stably transfected with wild-type furin and submitted to in vitro invasion assays. In this report we demonstrate a novel alternative pathway for the role of furin in tumor cell invasion that is mediated by endogenous production of processed and bioactive TGF $\beta$ 1.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES:

### Cell culture and transfection

LoVo type human colon adenocarcinoma cells (LoVo) (ATCC, Rockville, MD, USA) were cultured in complete media composed of Ham F-12 nutrient mixture (Sigma, Oakville, ON, Canada) with 10% fetal bovine serum (FBS) (BioMedia, Drummondville, QC, Canada). LoVo cells transfected with furin were generously provided by Dr. N. Kitamura (University of Tsukuba, Osaka, Japan). These cells were stably transfected with pCMVFur, a vector encoding wild-type (WT) furin cDNA or with a control vector pRC/CMV. Two clones expressing different amounts of WT furin mRNA [Fur1 (high levels) and Fur2 (low levels)] and one control clone (Neo) were obtained [42]. These individual clones were reselected in high concentrations of Geneticin (G-418; 1.2 mg/ml Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and the resulting Fur1 and Fur2 cultures now express similar amounts of furin mRNA. Fur1 cells were cotransfected with the furin inhibitor  $\alpha_1$ -antitrypsin PDX ( $\alpha_1$ -PDX)(pREP-10/PDX) or the truncated inactive form of  $\alpha_1$ -PDX ( $\alpha_1$ -PDXtr) (pREP-10/PDXtr) with FuGENE 6 using the method provided by the supplier (Roche, Laval, QC, Canada). Two clones transfected with  $\alpha_1$ -PDX (PDX-1 and PDX-2) and one control clone expressing  $\alpha_1$ -PDXtr (PDXtr) were selected according to their resistance to hygromycin. These cells were cultured in complete media containing two selecting agents, 600  $\mu$ g/ml G-418 and 450  $\mu$ g/ml Hygromycin (Roche). Human HT-1080 cell line (ATCC) was cultured in minimum essential medium (MEM) (Sigma) supplemented with 10% FBS.

### **Preparation of conditioned media**

HT-1080, LoVo, and Fur1 cells were seeded in six-well plates at  $6 \times 10^5$  cells/0.4 ml of serum-free media. Cells were incubated 24 h before collecting the conditioned media (CM). LoVo cells were seeded at  $6 \times 10^5$  cells/0.4 ml in serum-free media containing 0 to 5 ng/ml TGF $\beta$ 1. CM was collected after 24 h of incubation.

### **Gelatin zymography**

Analysis of gelatinolytic activity in CM was performed by gelatin zymography. Samples (20  $\mu$ l) of CM were mixed with 5  $\mu$ l of sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, 10% SDS, 50% glycerol) and incubated 15 min at 37°C before electrophoresis under nondenaturing conditions on 10% polyacrylamide gels containing 0.1% gelatin (ICN, Aurora, OH, USA). After electrophoresis, gels were washed 2 times for 15 min in 2.5% Triton X-100 and incubated 16 h at 37°C in activation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM CaCl<sub>2</sub>). Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue, and gelatinolytic activity was detected as a clear band against the blue background.

### **Filter coating with type IV collagen**

Polycarbonate filters (13 mm; Osmonics, Westborough, MA, USA), 8  $\mu$ m pore size, were coated with 100  $\mu$ l of type IV collagen (Sigma; 100  $\mu$ g/ml in 0.1% acetic acid). Filters were incubated 1 h at 37°C and washed in sterile water before air-drying overnight in a laminar flow hood under UV light. Coomassie Blue staining assessed coating uniformity of the filters.



### **Invasion assays**

Migration was assayed by an in vitro Boyden chambers method using filters coated with type IV collagen (see above). The upper and the lower wells, delimited by the filter, contained DMEM (Sigma) and 0.1% bovine serum albumin (Sigma) (minimal medium). In the upper wells,  $8 \times 10^4$  cells were seeded. Chambers were incubated 4 to 8 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. The filters were then fixed in 4% paraformaldehyde 15 min, permeabilized in methanol 10 min, and stained 10 min in 1% crystal violet (25% ethanol). Cells having reached the lower surface of the filters were visually counted using a light microscope (Micromaster, model CK, Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada) at 400-fold magnification. Ten random fields per filter were counted. Each experiment was made in duplicate.

Different conditions were assessed by the addition of inhibitory reagents in the minimal medium. The chemical inhibitor of matrix metalloproteinases, BB-3103 (generously provided by British Biotech Pharmaceuticals Limited, Oxford, England), was added to minimal medium at concentrations ranging from 0 to 0.5 µM. The MMP-2 neutralizing antibody (clone CA-4001; Medicorp Inc, Montreal, QC, Canada) and the isotype matched mouse IgG reagent grade antibody (Sigma) were used at a concentration of 2 µg/ml. Mouse monoclonal anti-TGFβ1-2-3 neutralizing antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) were added to the minimal medium at concentrations of 0 to 1 µg/ml. Mouse reagent grade IgGs (Sigma) were used as a control. In the experiments involving TGFβ1 stimulation, cells were pretreated with 0 to 5 ng/ml of human recombinant TGFβ1, a generous gift from Dr: Anthony F. Purchio (Oncogene Corp., Seattle, WA, USA), for 24

or 48 h before seeding them in the Boyden chambers. TGF $\beta$ 1 was also added in the same concentrations to the minimal medium during migration.

### **Immunoblotting**

LoVo, Neo, and Fur1 cells were cultured to confluence in 100-mm dishes in serum-free Ham F-12. LoVo and Fur1 cells were cultured at  $1 \times 10^6$  cells/well in six-well plates coated or not with type IV collagen (1 ml/well; 100  $\mu$ g/ml) (Sigma) in the presence of TGF $\beta$ 1 at concentrations ranging from 0 to 5 ng/ml for 24 h. Cell lysates and immunoblotting were performed as previously described [40]. The membranes were probed overnight with a rabbit antibody directed against human MT1-MMP hinge region (1:2000; Research Diagnostics Inc., NJ, USA, and reprobed with a donkey peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:5000; Amersham, Baie d'Urfé, QC, Canada). The immunoreactivity was developed with ECL Western blotting detection reagent (Amersham). As previously described, LoVo cells were infected with vaccinia recombinant for the TGF $\beta$ 1 precursor or an unrelated control vaccinia recombinant both used at a multiplicity of infection of 5 [32]. Eighteen hours after infection, supernatants were collected, separated on 12% reducing SDS-PAGE, and immunoblotted using an anti-human LAP antibody [13]. The detection of *fur* clones expressing  $\alpha_1$ -antitrypsin PDX or the serpin truncated form was performed as previously described using a rabbit  $\alpha_1$ -antitrypsin-specific antisera (1:2000; DAKO Corp., Carpinteria, CA) [32].

### **TGF $\beta$ bioassay**

The presence of active TGF $\beta$  in cell cultures or in conditioned medium was determined as stimulation of a TGF $\beta$ -responsive luciferase reporter p(SBE)<sub>4</sub>-Luc containing 4 copies of the Smad binding elements found in the human PAI-1 promoter sequence and values represent luciferase reporter gene activity as previously described [40 and 41].

### **Northern blot analysis**

Total RNA was extracted from cultured cells according to the previously described TRI-Reagent protocol (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) [42]. Northern blots were performed as previously described [43]. mRNA was detected using a rat [<sup>32</sup>P]-riboprobe for TGF $\beta$ 1 or furin. GAPDH was used as a control.

### **Luciferase assay**

Neo and Fur clones were transfected with 2  $\mu$ g of the TGF $\beta$ -inducible reporter (SBE)<sub>4</sub>-luc using the CaPO<sub>4</sub> precipitation technique as previously described [44]. After 20 h, luciferase activity was measured as previously described [45] and values were corrected for transfection efficiency using luciferase values from basic pGL2-Luc vectors.

## RESULTS:

### Impact of furin reconstitution on LoVo cells invasion capacity

To define the contribution of furin in tumor cell invasion, LoVo cells, a furin-deficient cell line, were stably transfected with wild-type (WT) furin (pCMV/Fur vector) giving rise to clones Fur1 and Fur2 or with a control vector (pRc/CMV; Neo clone) [39]. After reselection of the original clones, homogenous cultures expressing similar amounts of wild-type furin mRNA were obtained (Fig. 1A inset). Note that furin mRNA of the correct size (4.0 kb) is expressed by LoVo Neo cells, this corresponds to a mutated mRNA species [39 and 60]. Cell clones were subjected to an in vitro invasion assay using filters coated with type IV collagen, a major component of blood vessels basement membranes. Genetic complementation of LoVo cells with WT furin resulted in a time-dependent increase in the invasion capacity of the clones with maximal increase observed after 8 h of incubation (Fig. 1A).

To determine if this increased invasiveness was directly related to WT furin expression,  $\alpha_1$ -antitrypsin Portland ( $\alpha_1$ -PDX), a potent furin inhibitor [46], or a c-terminal truncated form of  $\alpha_1$ -PDX ( $\alpha_1$ -PDXtr), devoid of the RXXR<sup>358</sup> furin recognition site, were stably transfected into Fur1 clone.  $\alpha_1$ -PDX expression was examined by Western blot analysis in G-418- and hygromycin-resistant clones. Two clones expressing comparative levels of  $\alpha_1$ -PDX, PDX-1 and PDX-2, and one clone expressing similar amounts of  $\alpha_1$ -PDXtr, PDXtr, were selected for future studies (Fig. 1B inset). As illustrated in Fig. 1B, ectopic expression of  $\alpha_1$ -PDX efficiently blocked the increased invasive capacity observed in furin-complemented cells, leading to invasion levels similar to control cells (parental

LoVo and Neo). As a control, overexpression of an inactive version of the serpin had no significant impact on furin-induced cell invasiveness. These results led us to conclude that furin is involved in the invasion process of LoVo cells.

### **Implication of MMPs in furin-induced invasiveness**

Many proteases are known to be involved in extracellular matrix (ECM) degradation caused by tumor cells. Among others, matrix metalloproteinases (MMPs) appear to be responsible for much of the ECM degradation during the invasive process. To determine if furin-induced invasiveness through type IV collagen involves MMPs, BB-3103, a broad-spectrum hydroxamic acid-based inhibitor of MMPs, was used in the in vitro invasion assay. The addition of BB-3103 at concentrations known to efficiently block MMP activity (0.1–0.5  $\mu\text{M}$ ) (data sheet, British Biotech) significantly inhibited the increased invasion observed in the presence of WT furin (Fig. 2A). Basal invasion of Neo and LoVo cells was also slightly inhibited at the 0.5  $\mu\text{M}$  concentration. These results underlined the participation of MMPs in these processes.

Within the MMP family, MMP-2 seems to be closely associated with tumor invasion. A positive correlation was also established between tumor progression and the expression of MMP-2, within numerous human and animal studies [27, 28, 47, 48 and 49]. It is well documented that MMP-2 can efficiently degrade type IV collagen, the principal constituent of the basement membrane of blood vessels and the major physiological barrier to metastasis [26]. As a first step to delineate the role of MMP-2 in furin-induced invasiveness, MMP-2 expression was assessed by gelatin zymography assays. Analysis of the conditioned media produced by LoVo parental cells, Fur1 cells, and HT1080 cells, a

control human fibrosarcoma cell line known to produce large amounts of MMP-2, showed an increase in the levels of the 72-kDa proform (pro-MMP-2) upon reintroduction of WT furin in LoVo cells (Fig. 2B). Similar increase was also observed with the Fur2 clone (data not shown). An increase in the levels of the 68-kDa intermediate/processed form in *fur*-complemented cells is also apparent in overcontrasted images (data not shown). To further define the participation of MMP-2 in furin-induced invasiveness, Fur1 or Neo clones were incubated in the presence of MMP-2 neutralizing antibodies or isotype matching antibodies during the invasion assay. Results expressed in Fig. 2C indicate that neutralization of MMP-2 completely inhibited furin-induced invasiveness of LoVo cells without affecting basal migration, pointing out a major contribution of MMP-2 in furin-mediated invasion.

#### **MT1-MMP processing in furin-induced invasion in LoVo cells**

It was reported that endogenous furin can participate in MT1-MMP processing/activation leading to subsequent MMP-2 maturation through the formation of a cell-surface complex with TIMP-2 [50]. To assess whether furin complementation of LoVo cells led to variations in MT1-MMP processing, the relative levels of pro- (66 kDa) and mature (60 kDa) MT1-MMP [21] were evaluated by immunoblotting using antibodies that recognize both species. No significant changes in MT1-MMP maturation state upon WT furin complementation was observed. Control cells (parental LoVo and Neo cells) as well as furin-complemented cells (Fur1 and Fur2) predominantly produced the 60-kDa mature/active form of MT1-MMP (Fig. 3) and both exhibited the capacity to express increased levels of the active species upon stimulation with concanavalin A (Con A) (data not shown). In contrast, the maturation levels of TACE, another metalloproteinase that

exhibits an optimal RXK/RR furin recognition site [51 and 52], was significantly increased in furin-complemented LoVo cells (Srouf, N., Lebel, A., Dubois, C.M., unpublished results). These results indicate that in LoVo cells, the processing/maturation of MT1-MMP is a furin-independent event, implying that MT1-MMP is not a key mediator of furin-stimulated invasion in these cells.

### **Role of TGF $\beta$ in furin-induced invasion**

Since TGF $\beta$ 1 is known to participate in many stages of malignant progression [for reviews, see [33 and 34]] and since this growth factor was recently identified as an authentic furin substrate [32], we studied the impact of furin complementation on the production of endogenous TGF $\beta$ . For this, we transfected LoVo clones with the TGF $\beta$ -inducible reporter (SBE)<sub>4</sub>-luc, a reporter gene that specifically responds to bioactive TGF $\beta$  through Smad proteins [53]. Results represented in Fig. 4A indicate a 7 to 9 times increase in (SBE)<sub>4</sub>-luciferase in Fur transfectants. We also observed background luciferase activity in Neo cells, indicating that these cells produce a small amount of bioactive TGF $\beta$ . These results were confirmed by direct measurement of TGF $\beta$ 1 using an ELISA assay specific for bioactive TGF $\beta$ 1 (data not shown). These experiments indicate that furin-complemented clones produce increased amounts of bioactive TGF $\beta$  molecules. Also, TGF $\beta$  processing-competent convertases, expressed in furin-deficient LoVo cells (PACE-4, PC6, or PC7), may be involved in background luciferase activity as previously suggested [32].

The increased levels of bioactive TGF $\beta$ 1 was not due to an increase in mRNA expression since Northern blot analysis of Neo, Fur1, and Fur2 cells revealed no changes in the levels of TGF $\beta$ 1 mRNA expression between the different clones (Fig. 4B). On the other hand, Western blot analysis of supernatants from LoVo or Fur-complemented cells overexpressing TGF $\beta$ 1 (to detect TGF $\beta$ 1) revealed striking differences in the capacity of the cells to proteolytically process TGF $\beta$ 1. In supernatants from LoVo cells, we could detect only the 55-kDa pro-TGF $\beta$ 1 band containing the pro-domain or latency-associated protein (LAP), compared to furin-complemented cells that exhibited a loss of immunoreactive 55-kDa precursor band with the concomitant appearance of the 44-kDa pro-domain (LAP) and the mature 12.5-kDa TGF $\beta$ 1 species ( Fig. 4C). These results are consistent with the known capacity of furin to mature TGF $\beta$  to produce the latent form, a step known to be required for TGF $\beta$  activation [13 and 32].

The observation that Fur-complemented cells produced increased amounts of MMP-2 (Fig. 2B) and that purified MMPs, including MMP-2, were shown to proteolytically cleave and activate latent TGF $\beta$  in vitro [54 and 55] led us to test the possibility that MMP-2 might provide a cellular mechanism for latent TGF $\beta$  activation in furin-complemented cells. For this, the cells were incubated in the presence of inhibitors of either serine proteases (aprotinin), or serine/cysteine proteases (leupeptin), or metalloproteases (ilomastat), or in the presence of either purified recombinant MMP-2, or MMP-2-neutralizing antibodies. Active TGF $\beta$  produced by the cells was assessed using the p(SBE)<sub>4</sub>-Luc. The results in Table 1 suggest that the activation of TGF $\beta$  observed in furin-complemented LoVo cell cultures does not require the activity of serine/cysteine



proteases, but requires endogenous metalloprotease activity. Exogenous addition of recombinant MMP-2 to the cell culture significantly increases luciferase activity. In addition, incubation with 4 µg/ml MMP-2 neutralizing antibodies results in  $51 \pm 12\%$  inhibition ( $n = 3$ ) of active TGFβ produced by furin-complemented LoVo cells. Taken together, this indicates that MMP-2 is one of the metalloproteases involved in TGFβ activation by LoVo cells.

### **Contribution of endogenous TGFβ in furin-induced invasion**

Next we investigated the participation of endogenously produced and activated TGF in furin-induced invasion. Fur1 cells were incubated in the presence of various concentrations of anti-TGFβ1-2-3 neutralizing antibody or isotype matching antibodies that were added at the beginning of the in vitro invasion assay. As illustrated in Fig. 4D, a complete inhibition of the invasion due to furin complementation was observed at 1 µg/ml of TGFβ neutralizing antibody, a concentration known to inactivate 5 ng/ml of TGFβ (data sheet, R&D Systems). Overall, these results indicate that autocrine TGFβ action mediates furin-induced invasion of LoVo cells.

### **Mechanism of action of TGFβ in furin-induced invasion**

TGFβ is known to stimulate the expression of several metalloproteinases including MMP-2, MMP-9, and MMP-13 [56 and 57]. To provide insights into the mechanism of action of this cytokine in furin-induced invasion, we studied the impact of TGFβ1 on the expression of MT1-MMP, a known MMP-2 activator. For this, LoVo parental cells and Fur1 cells were stimulated 24 h with 0 to 5 ng/ml TGFβ1 and cell lysates were

immunoblotted with anti-MT1-MMP antibody. The results indicated that exogenous TGF $\beta$  did not significantly change the total amount of MT1-MMP expressed by parental or Fur1 cells or the relative proportion of mature and processed species (Fig. 5). Moreover, no additive effects was observed when TGF $\beta$ 1 was added to cells cultured on type IV collagen-coated wells, a matrix component previously reported to stimulate MMP production or activation [58 and 59]. This suggests that the mechanism of action of TGF $\beta$  in furin-stimulated LoVo cell invasiveness is not mediated by an increased production or activation of MT1-MMP. Another potential effect of TGF $\beta$  in our system could be a direct influence on MMP-2 production. To address this possibility, parental LoVo cells were incubated for 24 h with 0 to 5 ng/ml of exogenous TGF $\beta$ 1 and the amounts of MMP-2 in supernatants were analyzed by zymography assay. A concentration-dependent increase in the 72-kDa MMP-2 was observed upon TGF $\beta$ 1 cell stimulation with detectable changes observed at 0.5 ng/ml (Fig. 6A) and a 6.9-fold increase observed at 5 ng/ml. Therefore, TGF $\beta$  is a stimulator of MMP-2 expression in LoVo cells. To next evaluate the contribution of MMP-2 in TGF $\beta$  mediated invasiveness, parental LoVo cells were stimulated for 24 h with 5 ng/ml of exogenous TGF $\beta$ 1 and subjected to in vitro invasion in the presence of MMP-2 neutralizing antibody. Results expressed in Fig. 6B indicate that neutralization of MMP-2 abrogated TGF $\beta$ -induced invasion of LoVo cells. From these results, we concluded that the effect of TGF $\beta$ 1 on LoVo cell invasiveness was mediated by MMP-2, similarly to what was observed upon furin complementation. Collectively, our findings support the hypothesis that modulation of MMP-2 levels by autocrine TGF $\beta$ 1 is at least one of the mechanisms by which furin potentiates cell invasion through type IV collagen matrix.

## DISCUSSION:

The mammalian convertase furin plays a significant role in tumorigenesis and its overexpression was observed in a number of different cancer types. To date, however, few mechanisms of action have been investigated and described. Most of the information available concerns the invasion step, essential to metastasis, and designates MT1-MMP, through the activation of MMP-2, as the substrate mediating furin activity [4, 23 and 25]. In this report, we demonstrate that the maturation/activation of another furin substrate, TGF $\beta$ , is required for furin-induced invasion of LoVo cells across type IV collagen barrier. This process coincides with increased amounts of MMP-2 released from cells and requires intact MMP-2 activity. In contrast, furin expression or exogenous TGF $\beta$  stimulation did not modulate MT1-MMP expression/processing in the same cell system. Therefore, TGF $\beta$ 1 processing can be viewed as a novel additional/alternative mechanism that mediates furin-dependent cell invasion.

In this study, the direct contribution of furin in the tumor invasion process has been demonstrated in an experimental gene complementation cell system. This system consists of LoVo cells, a colon adenocarcinoma cell line, which harbors point mutations in both alleles of the *fur* gene, leading to the production of a defective enzyme [60]. Upon complementation with wild-type furin, LoVo cells exhibited a 2- to 2.5-fold augmentation of their invasion across type IV collagen matrix. The increased invasion was clearly due to furin activity since coexpression of  $\alpha_1$ -antitrypsin Portland ( $\alpha_1$ -PDX), a protein-based furin inhibitor, completely blocked the furin effect.  $\alpha_1$ -PDX is an engineered variant of the endogenous elastase inhibitor that now mimics the minimal consensus sequence (R-X-

X-R) required for furin recognition [61]. Studies showed that this serpin is a potent inhibitor of furin, which also inhibits PC6 to some extent with a  $K_i$  of 0.6 and 2.3 nM, respectively [46]. Our results are in line with recent studies showing that transfection of the furin and PC6 inhibitor  $\alpha_1$ -PDX into either head and neck squamous cell carcinoma cells or HT-29 human colon carcinoma cells reduced by at least 50% the in vitro and in vivo invasiveness of the cells [7 and 8]. Taken together, these observations clearly indicate the relevant participation of furin in the invasion process of different tumor cells.

The acquisition of an invasive phenotype is a prerequisite to more advanced steps of metastasis in which MMPs play an accessory role. As reported in several in vitro and in vivo model systems, there is a general correlation between the levels of MMPs expression, especially MMP-2, and the invasion/metastatic potential of tumor cells [for reviews, see [62 and 63]]. In addition to the increase in the levels of an individual MMP, malignant tumors tend to express a wider variety of MMPs than benign tumors. For example, colon adenocarcinoma cells, such as LoVo cells, express MT1-MMP, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, and MMP-11, but MMP-7 is the only MMP found in abundance in benign colonic tumors [64]. These MMPs can act in concert or as individual matrix-degrading enzymes. For example, both MT1-MMP and MMP-2 can mediate cell invasion as components of a proteolytic activity cascade involving MMP-2 or as two individual type IV collagen-degrading MMPs [63]. Using a wide-spectrum MMP inhibitor, BB3103, we observed a complete inhibition of the furin-promoting invasion capacity of LoVo cells, confirming that MMPs are essential for furin convertase action. To define which individual MMP is involved, we used a MMP-2 neutralizing antibody during the invasion assay. The inhibitory effect of this antibody was similar to the one

observed with BB3103, indicating that MMP-2, or a proteolytic cascade involving MMP-2 activation, mediates furin effect. Recently, Bassi et al. [4] have reported that the inhibition of furin in head and neck squamous carcinoma cells using the furin inhibitor  $\alpha_1$ -PDX efficiently blocks cell invasion, a process that correlates with a decrease in MMP-2 maturation. Our results expand these findings and clearly defines a relationship between MMP-2 and the invasion process mediated by furin.

As for all MMPs, MMP-2 is synthesized and secreted as a latent precursor that requires endoproteolytic cleavage of the propeptide to acquire activity. Current knowledge indicates that MMP-2 is activated after a two-step process involving an initial cleavage of the pro-enzyme required for a subsequent autocatalytic conversion of the intermediate form into a fully mature/active enzyme [26 and 65]. It is generally accepted that MT1-MMP is the enzyme that carries the initial cleavage of proMMP-2 [26]. MT1-MMP is a membrane-type metalloprotease that possesses two furin-like recognition sequences, RRXR<sup>92</sup> and RRKR<sup>111</sup>, at the junction between the pro-region [30] and the mature enzyme, and substantial evidence has been provided that MT1-MMP maturation by furin elicits functional activation of MMP-2 [20, 21 and 23]. Our results revealed no significant changes in MT1-MMP maturation state between control and furin-complemented LoVo cells. In fact, they all exhibited a higher proportion of the ~60-kDa mature MT1-MMP form under resting or cell-activated conditions, implying that MT1-MMP activation in these cells is a furin-independent mechanism. The expression of the mature/active MT1-MMP form in furin-deficient LoVo cells may explain, at least in part, basal levels of migration observed in these cells (see Fig. 1 and Fig. 2). Our results are in line with studies by Yana and Weiss [21] who observed that furin-deficient ROE.40 cells were

capable of MT1-MMP maturation. They also extend the work of Sato et al. [29] who provided evidence of differential furin requirement for the activation of MT1-MMP in uterine cervical versus dermal fibroblasts. The mechanism by which MT1-MMP is enzymatically cleaved in LoVo cells is not yet understood, but evidence is emerging that there could be alternative cellular pathways. Studies based on mutants bearing substitutions of furin recognition sequences within the MT1-MMP pro-peptide demonstrated that furin cleavage is not a prerequisite for the conversion of pro-MT1-MMP in breast carcinoma cell lines [30]. In the same system, it was also demonstrated that a hydroxamate class inhibitor efficiently blocked MT1-MMP activation, implying that a yet unknown metalloprotease could be involved in one possible alternative activation pathway [30]. Recent findings indicate that MT1-MMP itself could be this metalloprotease since it can function as a proprotein self-convertase [66]. Another possibility for MT1-MMP activation mechanism comes from known redundancy between PCs for furin-like cleavage sites. In addition to defective furin, LoVo cells are known to express PACE-4 [65 and 67], PC6 [67], and PC-7 [68 and 69]. The capacity of these PCs, in particular PACE-4 and PC6, to cleave the RXXR or RXKR recognition sites found within the MT1-MMP sequence is well established. Whereas PC7, like its kexin ancestor, seems to require Arg or Lys at the P6 position for optimal activity [70], a feature that is absent within the MT1-MMP propeptide sequence [24]. Therefore, it seems logical to propose that endogenous PACE-4 and/or PC6 acts as an alternative or complementary mechanism for MT1-MMP activation in LoVo cells, a possibility that could be addressed as soon as specific inhibitors of these convertases are developed.

Besides MT1-MMP, another furin substrate, which is known to play an important role in tumorigenesis and particularly in the tumor invasive process, is TGF $\beta$ 1. Interestingly, we have shown that the introduction of WT furin in LoVo cells increased the amounts of bioactive TGF $\beta$  detected in cell supernatants, a process that correlates with the ability of the cells to process overexpressed TGF $\beta$ 1. In parallel, no variation in the TGF $\beta$ 1 mRNA level was observed, strongly implying that in our system, furin acts directly through increased processing of the endogenous growth factor. The capacity of furin to process TGF $\beta$  was also demonstrated in several overexpression systems [13, 32 and 71], as well as in head and neck cancer cells, where furin was inhibited upon ectopic expression of the serpin  $\alpha_1$ -PDX [4].

The activation of TGF $\beta$  is known to be a two-step process involving cleavage of the pro-peptide (also called latency-associated peptide) by furin-like PCs in the secretory pathway followed by activation by other proteases or conformational changes. In the first reaction, the pro-peptide remains associated with TGF $\beta$  by noncovalent interactions that confer latency of the complex. Cancer cells secrete and activate a variety of proteases and several of them including the serine protease plasmin and metalloproteases such as MT1-MMP, MMP-2, and MMP-9 have been shown to have the capacity to activate TGF $\beta$  [57 and 58]. Here we showed that the activation of latent TGF $\beta$  in LoVo cells is, at least in part, MMP-2 specific by the use of an MMP-specific inhibitor as well as MMP-2-neutralizing antibodies. Moreover, addition of recombinant MMP-2 results in 2–3 times more bioactive TGF $\beta$ , suggesting that this metalloprotease participates in TGF $\beta$  activation in furin-complemented LoVo cells. The involvement of other metalloproteases known to

activate TGF $\beta$ , such as MMP-9 or MT1-MMP, is not excluded. Among them, MMP-9 would be a likely activator candidate since we observed that furin complementation occasionally resulted in a parallel increase in MMP-2 and MMP-9 in zymograms ( Fig. 2B, and data not shown) and since levels of both metalloproteases have been shown to be potentiated by exogenous TGF $\beta$  addition [56 and 57]. On the other hand, both the expression and maturation state of MT1-MMP is not affected by furin complementation, suggesting that in our system MT1-MMP, either directly or indirectly through MMP-2 activation, is not a major metalloprotease in TGF $\beta$  activation.

One of the mechanisms by which TGF $\beta$  can modulate the metastatic potential of tumor cells is by controlling their ability to break down and penetrate the basement-membrane barrier [72]. As for furin complementation, exogenous stimulation of parental LoVo cells with TGF $\beta$ 1 increased type IV collagen invasiveness suggesting that endogenous TGF $\beta$  can be a contributor to the more advanced malignant phenotype of furin-complemented cells. In particular, a 2-fold increase in invasiveness of LoVo cells, equivalent to levels obtained upon furin complementation, was observed following stimulation with TGF $\beta$ 1 at concentrations similar to the amounts produced by Fur1 and Fur2 cells (data not shown). The complete inhibition of furin-induced invasiveness of LoVo cells observed upon antibody-mediated neutralization of endogenous TGF $\beta$  confirms the role of this growth factor and further suggests that TGF $\beta$  represents the prominent furin substrate in our system. This is in accordance with recent studies indicating tight association between this convertase and the maturation of the TGF $\beta$ 1 precursor [32] whereas other furin substrates



relevant to cancer such as the MT1-MMP enzyme discussed above, have less direct relationship [29 and 31].

In normal cells, TGF $\beta$ 1 is known to maintain homeostasis of the extracellular cell matrix (ECM) by increasing the production of matrix components and protease inhibitors and by inhibiting the ECM degradation through the downregulation of proteases including MMPs [73]. In tumor cells, however, the response seems quite different. Following stimulation with TGF $\beta$ 1, LoVo cells considerably increased the 72-kDa MMP-2 pro-form levels in a concentration-dependent manner with no significant variation in MT1-MMP or MMP-9 expression. The increased invasiveness seen upon complementation with WT furin and the stimulation with exogenous TGF $\beta$ 1 were inhibited when MMP-2 was neutralized. This clearly indicates that TGF $\beta$ -mediated enhancement of MMP-2 represents an important autocrine mechanism for the role of furin in cell invasion. This is consistent with recent findings indicating that TGF $\beta$  stimulates the expression of this collagenase in a variety of cancer cells including ovarian cancer cells, bone-metastasizing cells, melanomas, brain metastasis as well as in pancreatic cancer cells [57, 74, 75 and 76]. Although the exact molecular mechanism underlying these variations is not clearly understood, depending on the cell type, MMP-2 has been reported to be regulated during synthesis or after secretion, through increased quantities of the native zymogen [56, 75 and 73]. PCR analysis of MMP-2 gene expression following exogenous stimulation with TGF $\beta$ 1 or WT furin complementation in LoVo cell did not show any variations in the mRNA levels (McMahon, S., Dubois, C.M., unpublished observation), despite concurrent elevations in secreted MMP-2. This suggests a nontranscriptional pathway for the cellular regulation of MMP-2 by TGF $\beta$ 1 in LoVo cells. These results are consistent with findings

by Sehgal et al. [56] who have identified a novel pathway for the regulation of MMP-2 expression in human prostate cancer cells, which occurs through delayed decay of secreted enzyme activity rather than through altered MMP-2 mRNA levels. Additional studies would be necessary to ascertain the existence of such a mechanism in LoVo cells.

TGF $\beta$  plays various roles in the process of malignant progression, and there is growing evidence that in the later stages of cancer development higher levels of TGF $\beta$  are actively secreted by various tumor types, including breast, prostate, pancreas, liver, brain, and head and neck squamous cell carcinomas, non-small cell lung carcinomas, and some leukemias [33]. Of interest, a significant correlation between TGF $\beta$  protein levels or TGF $\beta$  activity, and tumor progression/metastasis, was observed in patients with non-small cell lung carcinoma, breast cancer, and head and neck squamous cell carcinomas, three types of cancer in which furin was also found to be overexpressed [4, 9 and 77]. Therefore, it is tempting to speculate that the TGF $\beta$ -mediated tumor progression induced by furin is not exclusive to the cell type study herein, but is a more generalized mechanism that contributes to tumor invasion and metastasis of malignant cells. In these cases, TGF $\beta$  would probably not only serve as a MMP amplifier, but may also trigger furin overexpression, through an amplification loop that may explain, in part, furin overexpression in cancer. Supporting this, the capacity of TGF $\beta$ 1 to positively regulate the expression of the *fur* gene has been demonstrated in various normal cells as well as in hepatocyte carcinoma HepG2 [43 and 78]. Our current model for the role of furin in invasion is depicted in Fig. 7.

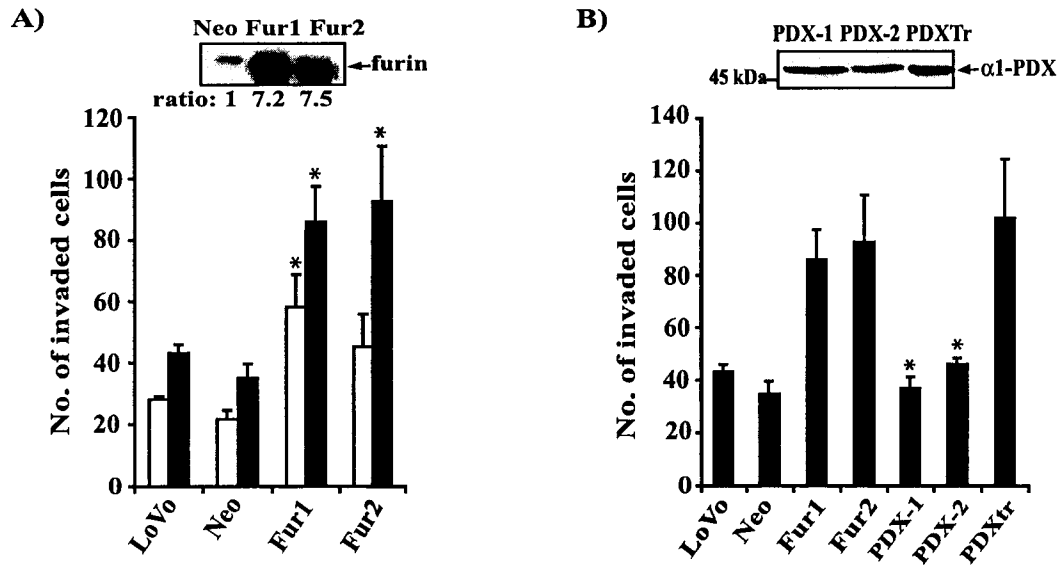
**ACKNOWLEDGEMENTS :**

S. McMahon is a recipient of a studentship of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and C.M. Dubois is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

**Table 1:**  
Involvement of metalloproteinases in TGF $\beta$  bioactivation

Experiment	p(SBE) <sub>4</sub> -Luc (fold induction)				
	Agents				
	—	Aprotinin	Leupeptin	Ilomastat	rMMP-2
1	1.0	1.06	0.99	ND	ND
2	1.0	1.02	1.33	0.45	3.90
3	1.0	0.97	ND	0.49	1.80
4	1.0	ND	ND	ND	3.76

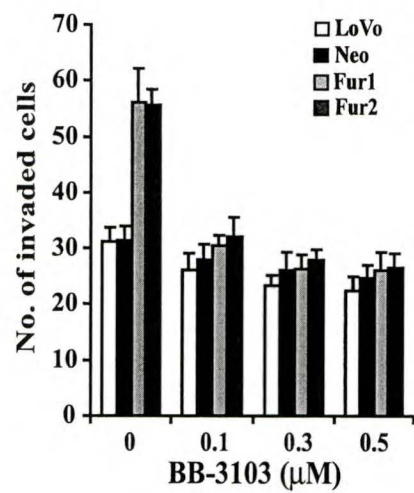
Cells were incubated in the presence of inhibitors of either serine proteases (aprotinin 0.3  $\mu$ M), or serine/cysteine proteases (leupeptin 10.5 mM), or metalloproteinases (Ilomastat 2.5  $\mu$ M), or in the presence of recombinant MMP-2 (10 ng/ml). Active TGF $\beta$  present in the cell cultures was determined using p(SBE)<sub>4</sub>-Luc as determined in the legend of Fig. 4. ND = not determined.



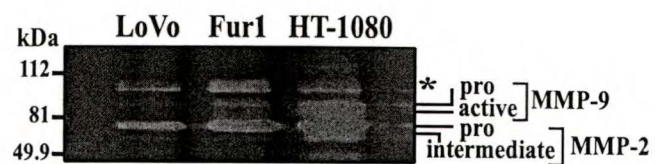
**Figure 1 : Furin reconstitution in LoVo cells increases invasion.** In vitro invasion was assessed in Boyden chambers using filters coated with type IV collagen. After the indicated migration time, cells that have migrated to the undersurface of the filter were visually counted using a microscope at a magnification of 400x. A) LoVo, Neo, Fur1 and Fur2 cells were allowed to migrate for 4h or 8h. Expression of wild-type furin mRNA by Fur clones was confirmed by Northern blot analysis using a furin- and a GAPDH-specific [<sup>32</sup>P]-riboprobe. B) PDX-1 and 2, PDXtr1 and 2 cells were allowed to migrate for 8h. Western blot analysis of cells extracts with a antisera against α1AT was performed to confirm the expression of the α1AT-PDX transgene. Results are expressed as the mean ± SEM, A)n=9 B)n=6. \*, p< 0.05 as compared to control Neo cells in A) or Fur1 cells in B)

**Figure 2 : Involvement of MMPs in furin-induced invasiveness.** A) LoVo, Neo, Fur1 and Fur2 cells were submitted to type IV collagen *in vitro* invasion assays in presence of BB-3103, a broad spectrum chemical MMP inhibitor used at 0 to 5  $\mu$ M for an 8h incubation period. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM, n=5. B) The production of MMP-2 in the conditioned media of LoVo, Fur1 and HT1080 cells (cultured for 24h in Ham F-12 media without serum) was analyzed by zymography. The apparent molecular weight mass of gelatinolytic band corresponding to the proform of the enzyme MMP-2 is 72 kDa and the intermediate form is 68 kDa, whereas the molecular weight of pro-MMP-9 is 95 kDa and the active form is 88 kDa. C) Neo and Fur1 cells were assessed in type IV collagen *in vitro* invasion assays in the presence of anti-MMP-2 neutralizing antibodies or isotype matched antibodies for an 8h incubation period. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM, n=3\*, p< 0.05 as compared to control antibody

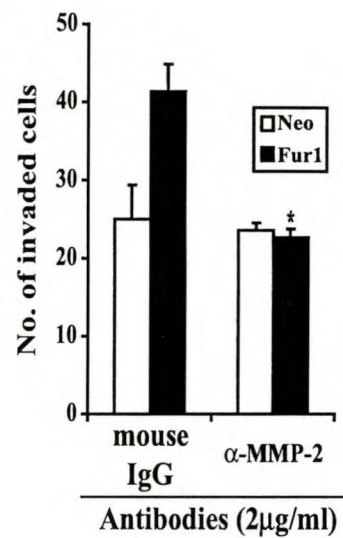
A)

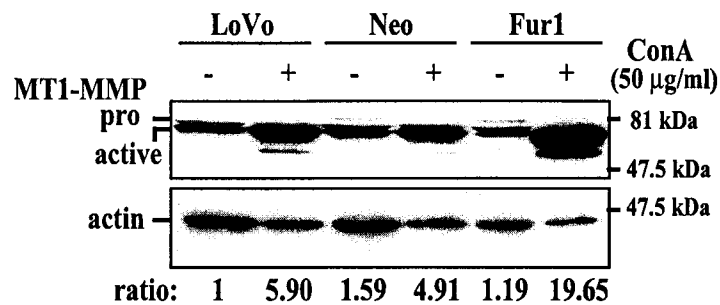


B)



C)



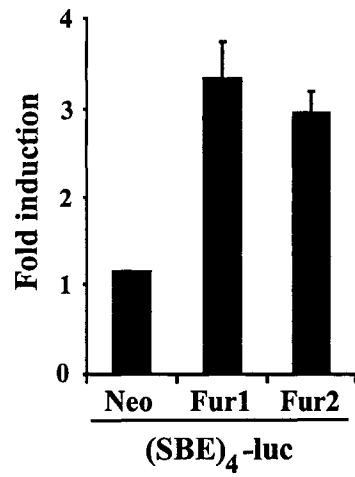


**Figure 3 : Involvement of MT1-MMP in furin-induced invasiveness.** Western blot analysis of MT1-MMP in LoVo, Neo and Fur1 cells. Cell lysates (50 ug/lane) were separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes. Immunoblotting was performed using a specific antibody against MT1-MMP or actin as an internal control. Two immunoreactive MT1-MMP bands can be visualized corresponding to the pro- (66kDa) and active (60kDa) forms. Representative experiment of n=3.

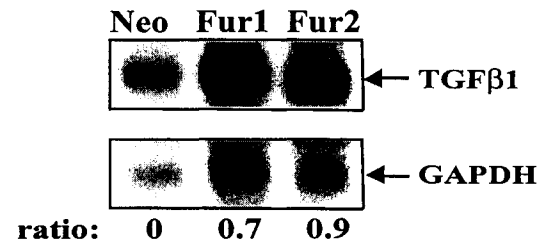


**Figure 4 : A role for TGF $\beta$ 1 in furin-induced invasiveness.** A) Neo and Fur clones were transfected with the TGF $\beta$ -inducible reporter (SBE)<sub>4</sub>-Luc. After 20 h, luciferase activity was measured and values were expressed as relative luciferase activity with control basic PGL2-Luc vector set at 1. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM, n = 3 to 5. (B) Northern blot analysis of TGF $\beta$ 1 mRNA from Neo, Fur1, and Fur2 cells. Total mRNA (5  $\mu$ g/lane) was hybridized with a riboprobe specific for TGF $\beta$ 1 or a cDNA probe for GAPDH. The autoradiogram and the densitometric ratios of TGF $\beta$ 1/GAPDH (control set at 1) are represented. (C) LoVo and Fur1 cells were infected with vaccinia recombinant for the TGF $\beta$ 1 precursor or an unrelated control vaccinia recombinant both used at a multiplicity of infection of 5. Eighteen hours after infection, supernatants were collected, separated on 12% reducing SDS-PAGE gels, and immunoblotted using an anti-human LAP antibody (revealing a 55-kDa pro-TGF $\beta$ 1 and a 44-kDa pro-region forms). (D) Neo and Fur1 cells were submitted to type IV collagen in vitro invasion assay in the presence of 0 to 1  $\mu$ g/ml anti-TGF $\beta$  neutralizing antibodies or isotype-matched antibodies for an 8-h time period. Results are expressed as the furin-induced invasiveness with the control value set at 1, n = 4. \*\* $P$  < 0.001, compared to control Fur1/Neo ratio.

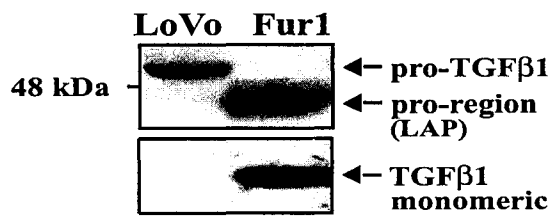
A)



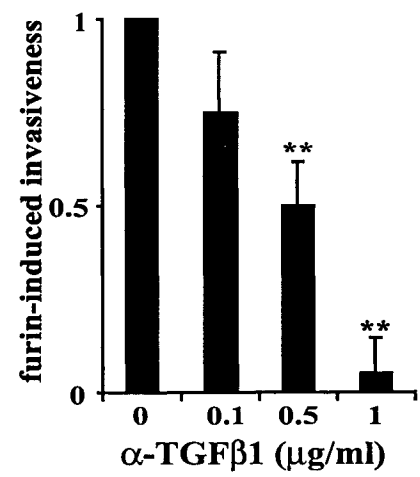
B)

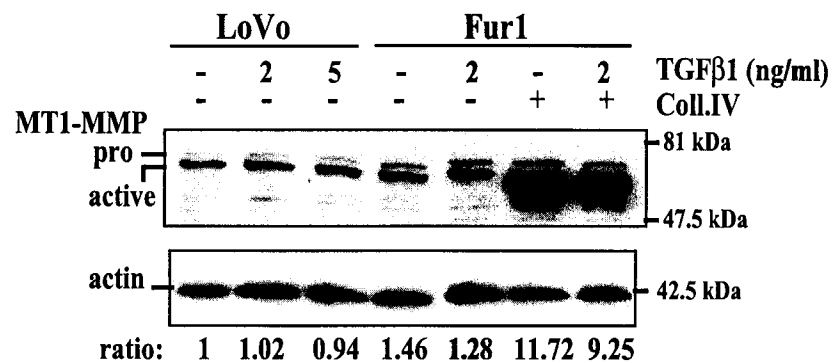


C)

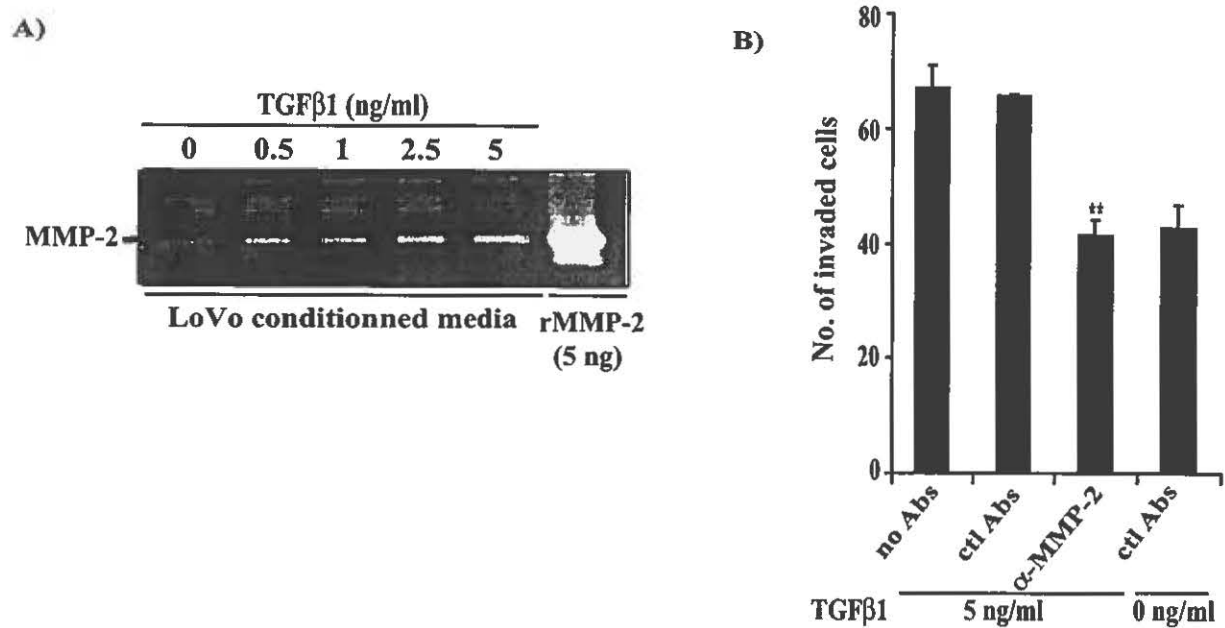


D)

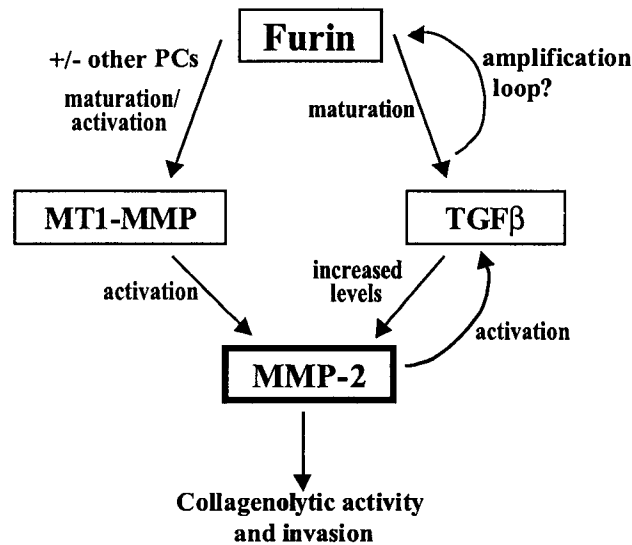




**Figure 5: Effect of TGFβ1 on MT1-MMP production.** Western blot analysis of MT1-MMP in LoVo and Fur1 cells stimulated for 24 h with 0 to 5 ng/ml TGFβ1 in the presence or absence of type IV collagen. Cells lysates (50 µg/lane) were separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Immunoblotting was performed using specific antibodies against MT1-MMP or actin as an internal control. Three different forms of the MT1-MMP protein can be visualized: the 66-kDa pro-form, the 60-kDa mature form, and an additional lower band (56 kDa) that may represent a MT1-MMP fragmentation product.



**Figure 6: A role for TGFβ1 in furin-induced invasion mediated by MMP-2.** (A) Parental LoVo cells cultured in the absence of serum were stimulated with increasing concentrations of TGFβ1 ranging from 0 to 5 ng/ml for a 24-h time period. MMP-2 levels in cell supernatants were analyzed by zymography in nondenaturing conditions. Recombinant human MMP-2 (5 ng/lane) presenting two forms of MMP-2, pro- (72 kDa) and active (62 kDa), was used as a control marker. (B) Parental LoVo cells were stimulated for 24 h with 0 to 5 ng/ml TGFβ1. Their invasive behavior was analyzed in an in vitro invasion assay for 8 h in the presence of 0 to 2 μg/ml of anti-MMP-2 neutralizing antibodies or isotype-matched antibodies. Results are expressed as the mean ± SEM, n = 3. <sup>##</sup>*P* < 0.001, compared to TGFβ1-stimulated control LoVo cells.



**Figure 7: Schematic diagram of the role of furin in the invasion process of tumor cells.**

Furin regulates the invasion of tumor cells via at least two complementary mechanisms. The processing of TGFβ by furin increases extracellular MMP-2 levels whereas MT1-MMP processing by furin and/or other members of the PC family results in the activation of MMP-2 [21]. A feedback loop is also proposed in which MMPs, possibly MMP-2, will act as a physiological activator of latent TGFβ. In addition, an amplification loop is postulated whereby TGFβ will in turn amplify *fur* gene transcription, a process that has been shown to result in increased maturation of furin substrates. In this scheme, the relevance of other potential furin substrates is not excluded, nor the possibility of a PC-independent mechanism.

## REFERENCES:

1. N.G. Seidah and M. Chretien, Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr. Opin. Biotech.* **8** (1997), pp. 602–607.
2. D.F. Steiner, The proprotein convertases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2** (1998), pp. 31–39.
3. M. Cheng, P.H. Watson, J.A. Paterson, N. Seidah, M. Chretien and R.P. Shiu, Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int. J. Cancer* **71** (1997), pp. 966–971.
4. D.E. Bassi, H. Mahloogi, L. Al-Saleem, R. Lopez De Cicco, J.A. Ridge and A.J. Klein-Szanto, Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol. Carcinog.* **31** (2001), pp. 224–232.
5. M. Cheng, N. Xu, B. Iwasiow, N.G. Seidah, M. Chretien and R.P. Shiu, Elevated expression of proprotein convertases alters breast cancer cell growth in response to estrogen and tamoxifen. *J. Mol. Endocrinol.* **26** (2001), pp. 95–105.
6. M.P. Rounseville and T.P. Davis, Prohormone convertase and autocrine growth factor mRNAs are coexpressed in small cell lung carcinoma. *J. Mol. Endocrinol.* **25** (2000), pp. 121–128.
7. D.E. Bassi, R. Lopez De Cicco, H. Mahloogi, S. Zucker, G. Thomas and A.J. Klein-Szanto, Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (2001), pp. 10103–10326.

8. A.M. Khatib, G. Siegfried, A. Prat, J. Luis, M. Chretien, P. Metrakos and N.G. Seidah, Inhibition of proprotein convertases is associated with loss of growth and tumorigenicity of HT-29 human colon carcinoma cells: importance of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor processing in IGF-1-mediated functions. *J. Biol. Chem.* **17** (2001), pp. 30686–30693.
9. M. Mbikay, F. Sirois, J. Yao, N.G. Seidah and M. Chretien, Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours. *Br. J. Cancer.* **75** (1997), pp. 1509–1514.
10. J.A. Schalken, A.J. Roebroek, P.P. Oomen, S.S. Wagenaar, F.M. Debruyne, H.P. Bloemers and W.J. Van de Ven, *fur* gene expression as a discriminating marker for small cell and nonsmall cell lung carcinomas. *J. Clin. Invest.* **80** (1998), pp. 1545–1549.
11. S. Takahashi, K. Hatsuzawa, T. Watanabe, K. Murakami and K. Nakayama, Sequence requirements for endoproteolytic processing of precursor proteins by furin: transfection and in vitro experiments. *J. Biochem.* **116** (1994), pp. 47–52.
12. A. Compagni and G. Christofori, Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br. J. Cancer* **83** (2000), pp. 1–5.
13. C.M. Dubois, M.H. Laprise, F. Blanchette, L.E. Gentry and R. Leduc, Processing of transforming growth factor  $\beta$ 1 precursor by human furin convertase. *J. Biol. Chem.* **270** (1995), pp. 10618–10624.

14. T. Collins, D. Ginsburg, J.M. Boss, S.H. Orkin and J.S. Pober, Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B chain: cDNA cloning and structural analysis. *Nature* **316** (1985), pp. 748–750.
15. C. Betsholtz, A. Johnsson, C.H. Heldin, B. Westermark, P. Lind, M.S. Urdea, R. Eddy, T.B. Shows, K. Philpott and A.L. Mellor, cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* **320** (1986), pp. 695–699.
16. S.J. Duguay, W.M. Milewski, B.D. Young, K. Nakayama and D.F. Steiner, Processing of wild-type and mutant proinsulin-like growth factor-Ia by subtilisin-related proprotein convertases. *J. Biol. Chem.* **272** (1997), pp. 6663–6670.
17. H. Posthaus, C.M. Dubois, M.H. Laprise, F. Grondin, M.M. Suter and E. Muller, Proprotein cleavage of E-cadherin by furin in baculovirus over-expression system: potential role of other convertases in mammalian cells. *FEBS Lett.* **438** (1998), pp. 306–310.
18. L.C. Lissitzky, J. Luis, J.S. Munzer, S. Benjannet, F. Parat, M. Chretien, J. Marvaldi and N.G. Seidah, Endoproteolytic processing of integrin pro- $\alpha$  subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem. J.* **346** (2000), pp. 133–138.
19. D. Pei and S.J. Weiss, Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* **375** (1995), pp. 244–247.



20. H. Sato, T. Kinoshita, T. Takino, K. Nakayama and M. Seiki, Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2. *FEBS Lett.* **393** (1996), pp. 101–104.
21. I. Yana and S.J. Weiss, Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol. Biol. Cell* **11** (2000), pp. 2387–2401.
22. F.C. Hubbard, T.L. Goodrow, S.C. Liu, M.H. Brilliant, P. Basset, R.E. Mains and A.J. Klein-Szanto, Expression of PACE4 in chemically induced carcinomas is associated with spindle cell tumor conversion and increased invasive ability. *Cancer Res.* **57** (1997), pp. 5226–5231.
23. E. Maquoi, A. Noel, F. Frankenhe, H. Angliker, G. Murphy and J.M. Foidart, Inhibition of matrix metalloproteinase 2 maturation and HT1080 invasiveness by a synthetic furin inhibitor. *FEBS Lett.* **424** (1998), pp. 262–266.
24. H. Sato, T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto and M.A. Seiki, Matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* **370** (1994), pp. 61–65.
25. N. Ruangpanit, D. Chan, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, J. Polarek, C. Yang, J.F. Bateman and E.W. Thompson, Gelatinase A (MMP-2) activation by skin fibroblasts: dependence on MT1-MMP expression and fibrillar collagen form. *Matrix Biol.* **20** (2001), pp. 193–203.

26. D.E. Kleiner and W.G. Stetler-Stevenson, Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **43** suppl (1999), pp. s42–s51.
27. R. Hanemaaijer, J.H. Verheijen, T.M. Maguire, H. Visser, K. Toet, E. McDermott, N. O'Higgins and M.J. Duffy, Increased gelatinase-A and gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors. *Int. J. Cancer* **86** (2000), pp. 204–207.
28. U.B. Hofmann, J.R. Westphal, E.T. Waas, A.J. Zendman, I.M. Cornelissen, D.J. Ruiter and G.N. van Muijen, Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br. J. Cancer* **81** (1999), pp. 774–782.
29. T. Sato, T. Kondo, T. Fujisawa, M. Seiki and A. Ito, Furin-independent pathway of membrane type 1-matrix metalloproteinase activation in rabbit dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **274** (1999), pp. 37280–37284.
30. D.V. Rozanov, E.I. Deryugina, B.I. Ratnikov, E.Z. Monosov, G.N. Marchenko, J.P. Quigley and A.Y. Strongin, Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys(574), the active site Glu(240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **276** (2001), pp. 25705–25714.
31. J. Cao, A. Rehemtulla, W. Bahou and S. Zucker, Membrane type matrix metalloproteinase I activates pro-gelatinase A without furin cleavage of the N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **271** (1996), pp. 30174–30180.

32. C.M. Dubois, F. Blanchette, M.H. Laprise, R. Leduc, F. Grondin and N. Seidah, Evidence that furin is an authentic transforming growth factor- $\beta$ 1-converting enzyme. *Am. J. Pathol.* **158** (2001), pp. 305–316.
33. B. Pasche, Role of transforming growth factor beta in cancer. *J. Cell. Physiol.* **186** (2001), pp. 153–168.
34. E. Plek and A.B. Roberts, Suppressor and oncogenic roles of transforming growth factor- $\beta$  and its signaling pathways in tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* **83** (2001), pp. 1–54.
35. M. Oft, K.H. Heider and H. Beug, TGF $\beta$  signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr. Biol.* **8** (1998), pp. 1243–1252.
36. L. Attisano and S.T. Lee-Hoeflich, The smads. *Genome Biol.* **2** (2001), pp. s3010–s3018.
37. A. Bandyopadhyay, Y. Zhu, M.L. Cibull, L.W. Bao, C.G. Chen and L.Z. Sun, A soluble transforming growth factor beta type III receptor suppresses tumorigenicity and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Cancer Res.* **59** (1999), pp. 5041–5046.
38. J.J. Yin, K. Selander, J.M. Chirgwin, M. Dallas, B.G. Grubbs, R. Wieser, J. Massague, G.R. Mundy and T.A. Guise, TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.* **103** (1999), pp. 197–206.

39. M. Komada, K. Hatsuzawa, S. Shibamoto, F. Ito, K. Nakayama and N. Kitamura, Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS Lett.* **328** (1993), pp. 25–29.
40. F. Blanchette, N. Rivard, P. Rudd, F. Grondin, L. Attisano and C.M. Dubois, Cross-talk between the p42/p44 MAP kinase and smad pathway in transforming growth factor  $\beta$  1-induced furin gene transactivation. *J. Biol. Chem.* **276** (2001), pp. 33986–33994.
41. M.H. Laprise, F. Grondin, P. Cayer, P.P. McDonald and C.M. Dubois, Furin gene (fur) regulation in differentiating human megakaryoblastic Dami cells: involvement of the proximal GATA recognition motif in the P1 promoter and impact on the maturation of furin substrates. *Blood* **15** (2002), pp. 3578–3587.
42. P. Chomczynski, A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15** (1993), pp. 532–537.
43. F. Blanchette, R. Day, W. Dong, M.H. Laprise and C.M. Dubois, TGF $\beta$ 1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. *J. Clin. Invest.* **99** (1997), pp. 1974–1983.
44. M.F. Langlois, K. Zanger, T. Monden, J.D. Safer, A.N. Hollenberg and F.E. Wondisford, A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. *J. Biol. Chem.* **272** (1997), pp. 24927–24933.

45. F. Blanchette, P. Rudd, F. Grondin, L. Attisano and C.M. Dubois, Involvement of Smads in TGFbeta1-induced furin (fur) transcription. *J. Cell. Physiol.* **188** (2001), pp. 264–273.
46. F. Jean, K. Stella, L. Thomas, G. Liu, Y. Xiang, A.J. Reason and G. Thomas, Alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998), pp. 7293–7298.
47. T. Itoh, M. Tanioka, H. Yoshida, T. Yoshioka, H. Nishimoto and S. Itohara, Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res.* **58** (1998), pp. 1048–1051.
48. D. Togawa, T. Koshino, T. Saito, T. Takagi and J. Machida, Highly activated matrix metalloproteinase-2 secreted from clones of metastatic lung nodules of nude mice injected with human fibrosarcoma HT1080. *Cancer Lett.* **146** (1999), pp. 25–33.
49. P.A. Forsyth, H. Wong, T.D. Laing, N.B. Rewcastle, D.G. Morris, H. Muzik, K.J. Leco, J.R. Johnston, P.M.A. Brasher, G. Sutherland and D.R. Edwards, Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br. J. Cancer* **79** (1999), pp. 1828–1835.
50. A.Y. Strongin, I. Collier, G. Bannikov, B.L. Marmer, G.A. Grant and G.I. Goldberg, Mechanism of cell surface activation of 72 kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* **270** (1995), pp. 5331–5338.

51. R.A. Black, C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March and D.P. Cerretti, A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385** (1997), pp. 729–733.
52. M.L. Moss, S.L. Jin, M.E. Milla, D.M. Bickett, W. Burkhardt, H.L. Carter, W.J. Chen, W.C. Clay, J.R. Didsbury, D. Hassler, C.R. Hoffman, T.A. Kost, M.H. Lambert, M.A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L.K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J.L. Su and J.D. Becherer, Cloning of a desintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* **385** (1997), pp. 733–736.
53. L.J. Jonk, S. Itoh, C.H. Heldin, P. ten Dijke and W. Kruijer, Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenic protein-inducible enhancer. *J. Biol. Chem.* **273** (1998), pp. 21145–21152.
54. M.A. Karsdal, L. Larsen, M.T. Engsig, H. Lou, M. Ferreras, A. Lochter, J.M. Delaisse and N.T. Foged, Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem.* **277** (2002), pp. 44061–44067.
55. Q. Yu and I. Stamenkovic, Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* **14** (2000), pp. 163–176.

56. I. Sehgal and T.C. Thompson, Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines. *Mol. Biol. Cell.* **10** (1999), pp. 407–416.
57. W.C. Duivenvoorden, H.W. Hirte and G. Singh, Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* **17** (1999), pp. 27–34.
58. E. Maquoi, F. Frankenno, A. Noel, H.W. Krell, F. Grams and J.M. Foidart, Type IV collagen induces matrix metalloproteinase 2 activation in HT1080 fibrosarcoma cells. *Exp. Cell Res.* **261** (2000), pp. 348–359.
59. A.K. Tzinia, P.V. Kitsiou, A.A. Talamagas, A. Georgopoulos and E.C. Tsilibary, Effects of collagen IV on neuroblastoma cell matrix-related functions. *Exp. Cell Res.* **274** (2000), pp. 169–177.
60. S. Takahashi, T. Nakagawa, K. Kasai, T. Banno, S.J. Duguay, W.J. Van de Ven, K. Murakami and K. Nakayama, A second mutant allele of furin in the processing-incompetent cell line, LoVo. Evidence for involvement of the homo B domain in autocatalytic activation. *J. Biol. Chem.* **270**(1995), pp. 26565–26569.
61. E.D. Anderson, L. Thomas, J.S. Hayflick and G. Thomas, Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J. Biol. Chem.* **268** (1993), pp. 24887–24891.
62. H.D. Foda and S. Zucker, Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug. Discov. Today* **6** (2001), pp. 478–482.

63. N. Johansson, M. Ahonen and V.M. Kahari, Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol. Life Sci.* **57** (2000), pp. 5–15.
64. K.J. Newell, J.P. Witty, W.H. Rodgers and L.M. Matrisian, Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Mol. Carcinog.* **10** (1994), pp. 199–206.
65. N.G. Seidah, M. Chretien and R. Day, The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie* **76** (1994), pp. 197–209.
66. D.V. Rozanov and A.Y. Strongin, Membrane type-1 matrix metalloproteinase functions as a proprotein self-convertase. Expression of the latent zymogen in *Pichia Pastoris*, autolytic activation, and the peptide sequence of the cleavage forms. *J. Biol. Chem.* **278** (2003), pp. 8257–8260.
67. L. Miranda, J. Wolf, S. Pichuanes, R. Duke and A. Franzusoff, Isolation of the human PC6 gene encoding the putative host protease for HIV-1 gp160 processing in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996), pp. 7695–7700.
68. N.G. Seidah, J. Hamelin, M. Mamarbachi, W. Dong, H. Tardos, M. Mbikay, M. Chretien and R. Day, cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996), pp. 3388–3393.



69. S. Hallenberger, M. Moulard, M. Sordel, H.D. Klenk and W. Garten, The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. *J. Virol.* **71** (1997), pp. 1036–1045.
70. J.S. Munzer, A. Basak, M. Zhong, A. Mamarbachi, J. Hamelin, D. Savaria, C. Lazure, G.N. Hendy, S. Benjannet, M. Chretien and N.G. Seidah, In vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7. *J. Biol. Chem.* **272** (1997), pp. 19672–19681.
71. T.A. Ayoubi, S.M. Meulemans, A.J. Roebroek and W.J. Van de Ven, Production of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells overexpressing the subtilisin-like proprotein converting enzyme furin. *Mol. Biol. Rep.* **23** (1996), pp. 87–95.
72. D.R. Welch, A. Fabra and M. Nakajima, Transforming growth factor beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990), pp. 7678–7682.
73. L.M. Matrisian, Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.* **6** (1990), pp. 121–125.
74. S.W. Lin, M.T. Lee, F.C. Ke, P.P. Lee, C.J. Huang, M.M. Ip, L. Chen and J.J. Hwang, TGFbeta1 stimulates the secretion of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and the invasive behavior in human ovarian cancer cells, which is suppressed by MMP inhibitor BB3103. *Clin. Exp. Metastasis* **18** (2000), pp. 493–499.
75. P.D. Brown, A.T. Levy, I.M. Margulies, L.A. Liotta and W.G. Stetler-Stevenson, Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and

interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Res.* **50** (1990), pp. 6184–6191.

76. V. Ellenrieder, S.F. Hendler, C. Ruhland, B. Wolfgang, G. Adler and T.M. Gress, TGF- $\beta$ -induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. *Int. J. Cancer* **93** (2001), pp. 204–211.

77. M. Cheng, N. Xu, B. Iwasiow, N. Seidah, M. Chretien and R.P. Shiu, Elevated expression of proprotein convertases alters breast cancer cell growth in response to estrogen and tamoxifen. *J. Mol. Endocrinol.* **26** (2001), pp. 95–105.

78. M. Negishi, D. Lu, Y.Q. Zhang, Y. Sawada, T. Sasaki, T. Kayo, J. Ando, T. Izumi, M. Kurabayashi, I. Kojima, H. Masuda and T. Takeuchi, Upregulatory expression of furin and transforming growth factor-beta by fluid shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21** (2001), pp. 785–790.

## **CHAPITRE II**

**L'hypoxie augmente l'expression de la convertase de proprotéines furine via le facteur de transcription HIF-1 : Impact sur la bioactivation de proprotéines.**

Stéphanie McMahon, Francine Grondin, Patrick P. McDonald, Darren E. Richard et  
Claire M. Dubois

Article publié dans le journal : The Journal of Biological Chemistry, Vol. 280, No. 8,  
p.6561-6569, 2005

## RÉSUMÉ :

L'hypoxie est un régulateur puissant de la tumorigenèse. Il agit principalement en régulant l'expression de plusieurs médiateurs associés à l'invasion et à l'angiogenèse, parmi lesquels, certains sont des substrats naturels de la convertase de proprotéines furine. L'analyse des promoteurs de la furine a révélé la présence de sites de liaison putatifs du facteur inductible à l'hypoxie-1 (HIF-1), un complexe transcriptionnel qui joue un rôle prédominant dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie. Nous démontrons dans cette étude que les niveaux d'ARNm *fur*, encodant la furine, sont remarquablement augmentés lors du traitement des cellules à l'hypoxie. Les résultats issus de la cotransfection d'une forme dominante négative du HIF-1 $\alpha$  chez des cellules de type sauvage ainsi que de la transfection d'une construction luciférase arborant le promoteur de la furine chez des cellules déficientes en HIF-1 indiquent que le facteur HIF-1 est essentiel à l'activation hypoxique du promoteur de la furine. Le facteur de transcription HIF-1 agit en se liant à un élément canonique de réponse à l'hypoxie, situé dans le promoteur de la furine, qui possède des propriétés de séquence « enhancer ». La régulation de la furine par l'hypoxie/HIF-1 a été associée à une augmentation de l'activation protéolytique de substrats de la furine, soit la MT1-MMP et le TGF $\beta$ 1. Nos travaux révèlent une nouvelle facette des conséquences physiologiques de l'hypoxie/HIF-1 via l'augmentation de l'activation protéolytique par la furine de proprotéines connues pour leurs implications dans la tumorigenèse.

**Contribution de l'étudiante :**

En ce qui concerne le deuxième chapitre de cette thèse, Stéphanie McMahon a participé activement à l'écriture de cet article sous la supervision de sa directrice de thèse. Également, l'étudiante a réalisé les expériences contenues dans ce chapitre à l'exception des travaux présentés aux figures 6, 7B et C. En fait, le gel de retardement de la figure 6 ainsi que les essais d'infection de la figure 7 ont été réalisés par Francine Grondin, technicienne au laboratoire de la Dre Claire Dubois. Il est important de noter que le Dr Patrick P. McDonald a participé à la mise au point de la technique de gel de retardement et que le Dr Darren E. Richard a fourni les plasmides encodant le HIF-1 $\alpha$ , le HIF-1 $\beta$  et la forme dominante négative du HIF-1 $\alpha$ .

**HYPOXIA-ENHANCED EXPRESSION OF THE PROPROTEIN CONVERTASE  
FURIN IS MEDIATED BY HIF-1: IMPACT ON THE BIOACTIVATION OF  
PROPROTEINS**

Stephanie McMahon<sup>1</sup>, Francine Grondin<sup>1</sup>, Patrick P. McDonald<sup>2</sup>, Darren E. Richard<sup>3</sup> and  
Claire M. Dubois<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Immunology Division

<sup>2</sup>Pulmonary Division  
Faculty of Medicine  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke, Qc, Canada  
J1H 5N4

<sup>3</sup>Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec  
Québec, Qc, Canada  
G1R 2J6

Running Head:

HIF-1-dependent hypoxic regulation of furin

Corresponding address:

Claire M. Dubois, Ph.D  
Tel.: (819) 564-5289  
Fax: (819) 564-5215  
Email: [Claire.M.Dubois@USherbrooke.ca](mailto:Claire.M.Dubois@USherbrooke.ca)

## ABSTRACT :

Hypoxia is a common tumorigenesis enhancer, mostly owing to its impact on gene expression of many angiogenic and invasion-related mediators, some of which are natural substrates for the proprotein convertase furin. Analysis of furin promoters revealed the presence of putative binding sites for HIF-1, a transcription complex that plays a pivotal role in cellular adaptation to hypoxia. In fact, we demonstrate herein that the levels of *fur* mRNA, encoding furin, are remarkably increased upon hypoxic challenge. Co-transfection of a HIF-1 $\alpha$  DN in WT cells or transfection of a furin promoter-reporter gene in HIF-1-deficient cells, indicated the requirement of HIF-1 for furin promoter activation by hypoxia. Direct HIF-1 action on the furin promoter was identified as canonical HRE site with enhancer capability. The hypoxic and/or HIF-1 regulation of furin correlated with an increased proteolytic activation of the substrates MT1-MMP and TGF $\beta$ 1. Our findings unveil a new facet of the physiological consequences of hypoxia/HIF-1, through enhanced furin-induced proteolytic processing/activation of proproteins known to be involved in tumorigenesis.

## INTRODUCTION:

The induction of angiogenesis and cell invasion by hypoxia is a hallmark of pathological processes such as wound healing, arthritis, and solid tumor formation. Oxygen deprivation induces gene expression of many polypeptides that participate in the establishment of new blood vessels and in the invasion phenotype (1-4). Several of these proteins are first synthesized as inactive pro-peptides that require maturation through limited endoproteolytic cleavage after a sequence of 2 or more basic residues (K or R) in order to acquire activity. Among them are growth factors such as transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor and one of its receptor (IGF, IGF-RI), hepatocyte growth factor (HGF), metalloproteinases including membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and the homotypic cell-cell interaction molecules E-cadherins and the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 (3,5-14). In the past decade, a novel family of 7 closely related mammalian subtilisin/kexin-like serine proteases with this cleavage specificity was discovered. They are grouped under the generic name of proprotein convertases (PCs) and include PC1/PC3, PC2, PC4, PC5/PC6, PC7 and PACE-4. Within this family, selected members exhibit a tissue-specific distribution, such as PC1, PC2, and PC4, while furin, PACE-4, PC5/PC6 and PC7 are expressed in a broad range of tissues and cell lines (for review see, (15,16). Among these convertases, furin is the first and so far the best-characterized enzyme. The biological importance of this PC arises from the large number and variety of bioactive proteins and peptides that can be generated through its activity, including key elements involved in normal and physiopathologic conditions such as cancer.



Recent studies indicate that tumor growth and malignant tumor phenotypes are regulated by the action of PCs, especially furin. In fact, inoculation of immuno-deficient mice with furin-inhibited cells resulted in delayed and lower incidence of tumor development as well as reduced tumor size compared to wild type (WT) cells. Interestingly, these observations were accompanied by a significant decrease in tumor vascularity (14). In normal tissues, furin is detectable at very low levels, however, elevated expression of this convertase has been reported in a variety of human cancers including breast tumors, head and neck tumors, glioblastomas and lung cancer (17-20). Furin expression has also been correlated with cancer aggressivity and was therefore proposed to have significant prognostic value (21). This suggests that the potentially deleterious effects of furin on the maintenance of cellular homeostasis under physiological conditions are avoided by very low cellular levels of expression.

The mechanisms by which the *fur* gene, encoding furin, is differentially expressed and regulated in tumoral conditions are still poorly understood. It is known that at least 3 distinct promoters, namely P1, P1A and P1B, direct its transcription (22). The *fur* transcripts generated differ in their 5' end but are all translated from the same AUG, giving rise to identical furin proteins. The P1A and P1B promoters resemble housekeeping genes with multiple Sp-1 binding sites. On the other hand, the P1 promoter bears inducible gene features with the presence of TATA and CAAT elements in the proximal region and has been shown to be transactivated by C/EBP- $\beta$ , GATA-1 and Smads (22-24). Interestingly, computer-assisted analysis of the furin promoters uncovered

the presence of putative hypoxia responsive elements (HRE) also found in many genes regulated by oxygen deprivation such as vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin (EPO) and glucose transporter-1 (GLUT-1) (25-28). Transactivation of such *cis*-acting elements is mediated by the specific binding of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). This transcription factor comprises HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$ /ARNT subunits, which are members of the basic-loop-helix-PAS protein family (29). Both subunits are constitutively expressed, but HIF-1 $\alpha$  is maintained at low cellular levels in normoxic conditions through proteasomal degradation via the action of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. Under hypoxic conditions, HIF-1 $\alpha$  escapes degradation and translocates to the nucleus where it heterodimerizes with HIF-1 $\beta$  (30-35). The consensus HIF-1 binding sequence (HBS) was determined to be 5'-RCGTG-3' (R=A/G) (36), though recent reports have indicated that for optimal hypoxic induction, several HIF-1-inducible genes require a HRE composed of a HBS and a HAS (HIF-1 ancillary sequence) (5'-CACG/AG/T/C-3'), which forms an imperfect inverted repeat (37).

Based on the presence of *cis*-acting HRE elements within their promoter/enhancer regions, HIF-1 transcriptionally activates a variety of genes that can convey survival and proliferation of tumor cells by mediating angiogenesis, glucose uptake, invasion and metastasis, thereby promoting tumorigenesis. In accordance with this, nuclear accumulation of HIF-1 protein has been reported recently in human common cancer and cell lines including, head and neck, glioblastomas, breast, colon, pancreatic, and prostatic (38-40), which are pathological conditions where furin was also found to be overexpressed. This finding, coupled with the observation that *fur* promoters contain

putative HRE motifs, prompted us to investigate the regulation of the *fur* gene by HIF-1. In this report, we demonstrate that the expression of furin mRNA is rapidly increased in oxygen-deprived cells through HIF-1, which binds to a functional consensus HRE sequence in the *fur* P1 promoter. Increased furin expression in hypoxic cells impacted the maturation of furin substrates MT1-MMP and TGF $\beta$ . These findings provide a mechanism by which furin could be increased in solid tumors, and thereby impact the bioavailability of tumorigenic factors.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES:**

**Cell Culture** - The hepatoma cell lines HepG2 (human) and Hepa-1 c1c7 (mouse) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA). The Hepa-1 c4 cells, derived from Hepa-1 c1c7 cells, were a generous gift from Dr. Oliver Hankinson (University of California, LA, USA). These cell lines were cultured in Minimal Essential Medium (MEM) (Gibco BRL, Burlington, On, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) and 40 µg/ml garamycin (Schering Canada inc., Pointe-Claire, PQ, Canada) in a humidified 95% air/5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C (normoxic condition).

For hypoxic experiments, cells were serum starved and placed in a sealed humidified chamber maintained at 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and balance in N<sub>2</sub> for different time-periods as indicated in figure legends.

**Northern blot analysis** - HepG2 cells were serum starved and cultured in normoxia or hypoxia for time-periods ranging from 4 to 24 hours. Total cellular RNA was extracted from cells according to the previously described TRI-Reagent protocol (41). Northern blot analysis was performed as previously described using furin, PACE-4, and PC-7 rat riboprobes (42). An 18S probe was used as an internal control.

**Western blot analysis** - HepG2 cells were cultured in serum-free MEM in normoxic or hypoxic conditions for 16 h. Eight hundred thousand Hepa-1 c1c7 and c4 cells/10 cm plates were infected as previously described (23) with adenovirus encoding human pro-TGF $\beta$ 1,  $\alpha$ 1-antitrypsin PDX ( $\alpha$ 1-PDX) or GFP only (control virus) and cultured in normoxia or hypoxia for 16 h. Total cell lysates and immunoblotting were performed as previously described (43). The membranes were probed overnight with antibodies directed against human MT1-MMP hinge region (Research Diagnostics Inc, NJ, USA) or human LAP (TGF- $\beta$ 1) (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA). Secondary antibody were peroxidase-conjugated anti-mouse (1:2500) IgG or anti-goat IgG (1:8000), respectively (Amersham, Baie d'Urfé, Qc, Canada). Blots were developed using ECL Western blotting detection reagent (Amersham).

**Plasmids for transient transfection** - The human *fur* promoter-luciferase constructs pGL2-Basic, pGL2-P1, pGL2-P1-*SacI*, pGL2-P1-*NheI*, pGL2-P1-*KpnI*, pGL2-P1A, and pGL2-P1B were generously provided by Dr Torik A. Y. Ayoubi (University of Leuven and Flanders Interuniversity, Belgium). The pCDNA3-HIF-1 $\alpha$ , pCDNA3-HIF-1 $\beta$ , and pCDNA3-HIF-1 $\alpha$  DN have been previously described (44,45).

**Luciferase assays** - HepG2, Hepa-1 c1c7 and Hepa-1 c4 cells were transiently transfected by CaPO<sub>4</sub> precipitation technique using a Mammalian Cell Transfection Kit (Specialty Media, Lavallette, NJ, USA) as previously described (46). Briefly, twenty-four hours prior to transfection, cells were plated at a density of 125 000 cells/well in 6-well plates. Cells were transfected with 2 to 4  $\mu$ g plasmids/well, as indicated in figure legends.

Twenty hours following transfection, cells were serum starved 3-4 h prior to overnight exposure to hypoxic or normoxic environment. Cell lysates were assayed for luciferase activity as previously described (47). The control pGL2-Basic vector was routinely used as an internal control of transfection. Values were normalized for transfection efficiency as previously described (23,47).

**Site-directed mutagenesis** - The H4-HRE and H5-HRE sequences located at position –1011 and –863 respectively, within the P1-*NheI* promoter were mutated by using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Distinct mutations were generated by replacing the H4 motif 5'-TAGTGAC-3' by 5'-TAGCAAC-3' and/or the H5 motif 5'-GGCGTGGTGGCTCACGCC -3' by 5'-GGCAACGTGGCTCGCTTC-3'. Each mutation was verified by direct sequencing.

**Plasmid construction** - The oligonucleotides encoding four tandem repeats containing the wt H5-HRE sequence 5'-GACCGGGCGTGGTGGCTCACGCCTAATA-3' or the H5-HRE sequence mutated (same mutations as in site-directed mutagenesis) of the *fur*-P1 promoter were synthesized (Gibco), annealed, and cloned into the *KpnI-NheI* sites of pGL3-TK-basic vector (generously provided by Dr Negishi, National Institutes of Health, North Carolina, USA)

**Electrophoretic mobility shift assays** - Nuclear extracts were prepared as previously described with the addition of 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 50 nM MG-132 in extraction buffer (48,49) followed by a 2 h dialysis step against modified Z-100 buffer (25 mM Tris-HCL (pH 7.6), 0.2 mM EDTA, 100 mM KCL, 20% glycerol, 2 mM DTT, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50

nM MG-132) (50). Gel mobility retardation assays (EMSA) were performed as previously described with few modifications (48,49). Briefly, 5 µg of nuclear extracts were incubated with 4x10<sup>5</sup> CPM of <sup>32</sup>P-labelled double stranded probes in modified Z-100 buffer containing 7.5 mM DTT and 0.1 µg calf thymus DNA/20 µl (Sigma). The sequences of the sense strands of the oligonucleotides used for EMSA were as follow: 5'-CGGGCACGGTGGCTCACGCCTGTA-3' (H1), 5'-GTGTCTGCTCCCCAAGTGCATAAG-3' (H2) 5'-GCTAATGTTTAGTGACTAGGGATGCGAC-3' (H4); 5'-GGACCGGGCGTGGTGGCTCACGCCTAATA-3' (wt H5), 5'-GGACCGGGAAAGGTGGCTCAACCCTAATA-3' (mut H5), 5'-GGACCGGGCGTGGTGGCT-3' (H5-HBS). Mouse anti-HIF-1α (Novus Biologicals, Littleton, Co, USA) and isotype-matched (Sigma) antibodies were used in supershift assays.

***Measure of bioactive TGFβ1*** - Supernatants of Hepa-1 c1c7 and c4 cells infected with adenovirus were assayed for TGFβ1 using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay specific for bioactive TGFβ1 (R&D Systems). Supernatants were activated 10 minutes at 80°C before TGFβ1 detection.

## RESULTS

***Kinetics of furin, PACE-4 and PC7 expression following hypoxia exposure*** - Hypoxia is a common tumorigenesis enhancer, mostly owing to its impact on gene expression of many angiogenic and invasion-related mediators, some of which are natural substrates for the convertase furin. Since the emerging role of proprotein convertases (furin) in tumorigenesis, we postulated that furin could be regulated by hypoxia to achieve adequate proteolytic maturation of angiogenic and/or tumorigenic substrates. To test this hypothesis, HepG2 cells were cultured in normoxic (21% O<sub>2</sub>) or hypoxic (1% O<sub>2</sub>) conditions for time-periods ranging from 4 to 24 hours. Results expressed in Figure 1 indicate that hypoxia is a strong inducer of furin mRNA accumulation in HepG2 cells with a maximum of 18-fold increase observed at 24 hours, whereas PACE-4 and PC7 mRNA levels were mostly unaffected. Extended cell culture in hypoxic conditions (48 hours) resulted in no additional increase in furin mRNA levels (data not shown). These results indicated that furin, but not the other convertases PACE-4 or PC7, is a hypoxia-inducible gene.

A similar increase in furin mRNA by hypoxia was also observed in other cell lines including RAW 264.7 mouse macrophages, primary rat synoviocytes, as well as mouse Hepa-1 c1c7 hepatoma cell line (data not shown). This indicates that the regulation of the furin gene by hypoxia is extended to various cell types and species.

***HIF-1 is required for the hypoxic response of the fur P1 promoter*** - Computer-assisted analysis of *fur* promoter sequences revealed the presence, within all three *fur* promoters,



of putative HIF-1 binding sites (HBS), including several closely spaced HIF-1 ancillary sequences (HAS) characteristic of HIF-1 regulated genes (Fig. 2A) (37). This suggested that HIF-1 may regulate *fur* promoters activity under hypoxic conditions. To address this possibility, HepG2 cells were transiently transfected with either P1, P1A or P1B promoter-Luc constructs, or with the promoter-less vector pGL2-Luc. Cells were incubated overnight under normoxic or hypoxic conditions, and luciferase activity was measured. As illustrated in Figure 2B, luciferase activity of the P1 promoter was increased 3.1-fold under low oxygen tension, while such a treatment had a milder influence on the P1A or P1B promoters, with 1.8- and 1.4-fold induction, respectively. Further studies were therefore performed with the most hypoxia sensitive P1 promoter.

To identify the P1 promoter region(s) implicated in the hypoxic response, 5' deletion constructs were tested in luciferase assays. As demonstrated in Figure 3B, deletion constructs up to position -1221 demonstrated comparable increases in luciferase activity following oxygen deprivation. However, further deletion of the promoter to position -413 strongly reduced the hypoxic response, indicating the presence of hypoxia sensitive site(s) within the -1221 to -413 region.

In parallel experiments, the reporter constructs were cotransfected with vectors encoding HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$ . Results presented in Figure 3C indicate that HIF-1 stimulates at similar levels P1 promoter activity up to deletion -1221, however, the following deletion fragment abrogated the response to HIF-1. Thus, the response of P1 promoter fragments

to HIF-1 overexpression correlates with their response to hypoxia, suggesting that hypoxia response element(s) within P1 promoter are HIF-1 binding element(s).

To determine whether HIF-1 is indeed required for transcriptional activation of the *fur*-P1 promoter by hypoxia, we either co-transfected a dominant negative isoform of HIF-1 $\alpha$  in HepG2 cells or the P1-promoter-luc construct was transfected into the Hepa-1 c4 hepatoma cell line, which lacks HIF-1 $\beta$ /ARNT protein and thereby cannot form the HIF-1 transcription complex (51). Results in Figure 4 A and B indicated that forced expression of the dominant negative HIF-1 $\alpha$  isoform in HepG2 cells greatly reduced both P1 and P1-*Nhe1* transactivation in response to hypoxic challenge. Similarly, the P1 luciferase reporter gene was activated in the parental Hepa-1 c1c7 cell line but not in the HIF1 $\beta$ /ARNT-deficient Hepa-1 c4 cells (Fig. 4C). Together, these results clearly demonstrate the requirement of HIF-1 for the hypoxic activation of the *fur*-P1 promoter. Results from the dominant negative experiment also suggest that the H4- and/or H5-HRE sites within the P1-*Nhe1* promoter fragment are functional.

***Functional analysis of HIF-1 binding sites within the P1-Nhe1 promoter fragment*** - To define the functionality of the HRE sites in the P1-*Nhe1* promoter fragment, site-directed mutagenesis was performed on the two putative H4- and H5-HRE sites. This resulted in 3 distinct mutants - P1-*Nhe1*H4 MUT, P1-*Nhe1*H5 MUT and P1-*Nhe1*H4/H5 MUT - that correspond to elimination of the H4-HRE, H5-HRE, or both sites, respectively. Expression of the plasmid encoding the P1-*Nhe1*H4 MUT (Fig. 5A) resulted in a similar luciferase activity in response to HIF-1 as the WT P1-*Nhe1*, while mutation of the H5 site

reduced HIF-1 stimulation to 10 % of the WT fragment, indicating that this site is critical for the HIF-1 response. Mutation of both H4 and H5 sequences did not result in additional inhibition, indicating that these sites do not act in cooperative manner.

To investigate whether the H5-HRE site within the furin P1 promoter has enhancer activity in response to HIF-1, four tandem repeats of a 28 nt sequence that encompasses both the HBS and the HAS of the H5-HRE binding site (4XH5 *fur*-P1 WT), or a mutant sequence (4XH5 *fur*-P1 MUT) with a 6-nucleotide substitution that eliminates both the HBS and the HAS sites, were cloned upstream of the minimal thymidine kinase (TK) promoter and the luciferase reporter gene. Luciferase activity assays of the resulting WT construct indicated an 8.9-fold increase in the presence of co-expressed HIF-1 (Fig. 5B), whereas the activity of the mutant construct remained close to basal value. Taken together, these results demonstrate that the H5-HRE site present in the *fur* P1 promoter is critical for HIF-1-induced enhancer activity.

To ensure that the identified H5-HRE site could physically bind HIF-1, we performed electrophoretic mobility shift assays using a 28-bp probe containing the WT H5-HBS and HAS sites. Oligonucleotides encoding the H4 site were also used for comparison. Three retarded bands (R1, R2 and R3) were obtained with nuclear extracts from hypoxic cells (Fig. 6, lane 2), whereas nuclear proteins from normoxic cells showed only one major band of constitutive binding activity (lane 1). In contrast, no hypoxia-inducible complexes were observed when using the H4 oligonucleotide (lanes 9-11). All retarded complexes demonstrated specificity in their binding to H5 WT sequence since they were efficiently competed using a 100-fold molar excess of unlabeled oligonucleotides (wt; lane 5). In

contrast, no competition was observed with oligonucleotides containing mutations in order to eliminate the H5-HBS and HAS sites (mut; lane 6). Also, no hypoxia-driven complexes were detected when the H5 mut oligonucleotide was used as a radiolabeled probe (lanes 7-8). An anti-HIF-1 $\alpha$  antibody supershifted, into 2 slower migrating bands, the R1, R2 and R3 complexes (lane 3), whereas an isotype-matched control antibody was inefficient (lane 4). This indicates that HIF-1 is a component of the three retarded complexes.

Results shown in Figure 3B suggested that the most distal promoter fragment encompassing the two putative H1- and H2-HRE sites may participate in P1 induction by hypoxia since its deletion slightly reduces the overall response. To test this possibility, the H1 and H2 oligonucleotides were included in a parallel EMSA assay (lanes 12-17). Results indicate the absence of hypoxia-induced complexes for both probes, when the autoradiograms were revealed within standard (16 h) exposure time. However, longer exposures resulted, for the H1 probe, in a similar pattern of hypoxia-induced and antibody supershifted complexes as observed with the H5 probe (data not shown). This suggested that weak interactions between HIF-1 and the H1 site can occur, in addition to the stronger interactions detected in the case of the H5 site.

Recent data demonstrates in several HIF-1 inducible genes a common HRE structure that consists of a HAS and a HBS site (37,52-54). Since H5 contains both sites, we investigated whether the HBS site is sufficient for HIF-1 interaction. To this end, a probe containing only the H5-HBS site was radiolabeled and tested in EMSA. Results in Figure

6 (lanes 18-20) indicate that removal of the HAS site impairs HIF-1 binding to the H5-HRE sequence, indicating that both the HAS and HBS are indeed required.

***Impact of increased furin expression on substrate maturation*** - We investigated whether *fur* mRNA levels correlate with the extent of proteolytic conversion of the furin substrates, MT1-MMP and TGF $\beta$ 1. These substrates contain a proven furin activation site and both have been shown to profoundly affect many aspects of tumor progression. (7,11,12,24,55). We therefore analyzed by immunoblotting MT1-MMP-related digestion products obtained from HepG2 hepatoma cells, which express high levels of endogenous MT1-MMP. As shown in Fig. 7A, a high molecular weight band (66 kDa) corresponding to the unprocessed MT1-MMP precursor is observed in both culture conditions. Hypoxia resulted in an augmented MT1-MMP production, as well as in the conversion of the MT1-MMP precursor into the 60-kDa mature form. For TGF $\beta$  maturation, we analyzed by Western blotting lysates from the Hepa-1 c1c7 hepatoma cell line overexpressing this growth factor (to permit immunodetection). As demonstrated in Fig. 7B, hypoxia-treated cells exhibited, in addition to the 55 kDa precursor band, a 44-kDa product corresponding to the proteolytically processed pro-domain product (7).

In the same experiment, we studied whether hypoxia-induced increase in TGF $\beta$  maturation by furin is mediated by HIF-1. For this, TGF $\beta$  digestion products were analyzed in the derived HIF-1-deficient Hepa-1 c4 clone and compared to those obtained with the Hepa c1c7 cells. Results indicated that only the HIF-1-proficient Hepa-1 c1c7 cells produced a mature TGF $\beta$ 1 species under hypoxic condition, while such maturation

product was absent in the c4 clone. In parallel, the increased production of active TGF $\beta$  under hypoxia was restricted to the Hepa-1 c1c7 cells expressing the HIF-1 complex (Table I). These results indicate that hypoxia-induced TGF $\beta$  endoproteolysis by furin is indeed regulated by endogenous HIF-1. Thus, hypoxia/HIF-1-induced endogenous *fur* gene expression correlates with an increase in MT1-MMP and TGF $\beta$ 1 endoproteolysis.

Previous data obtained in our laboratory clearly defined furin as an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme (24). In order to ensure that the proteolytic maturation of TGF $\beta$ 1 in hypoxic conditions is achieved by furin, we overexpressed TGF $\beta$ 1 and the previously described furin inhibitor  $\alpha$ 1-PDX in Hepa-1 c1c7 and c4 cell lines (56). As demonstrated in Figure 7B, the production of the mature form of TGF $\beta$ 1 observed in hypoxia-treated WT c1c7 clone was inhibited upon  $\alpha$ 1-PDX expression. In parallel, hypoxia-induced release of bioactive TGF $\beta$ 1 in Hepa-1 c1c7 cell conditioned media was blunted to control normoxic cells following the expression of  $\alpha$ 1-PDX with measured amounts of 4.44 ng/ml vs 0.5 ng/ml, respectively. Thus, furin is the enzyme responsible for the hypoxia-induced conversion of pro-TGF $\beta$ 1 into its bioactive form.

## DISCUSSION:

In this report we provide evidence that the *fur* gene is induced upon hypoxia exposition and we identified a region within its promoters that regulates furin transcription under hypoxia, through HIF-1 activity. More significantly, we demonstrate that such hypoxic/HIF-1 regulation of furin correlated with an increased proteolytic activation of the substrates MT1-MMP and TGF $\beta$ 1. Our study unveiled a new facet for the role of HIF-1 in tumor progression, through enhanced proteolytic processing/activation of proproteins.

Three alternative promoters can drive the transcription of the *fur* gene (22). Promoters P1A and P1B resemble housekeeping genes with multiple Sp1-binding sites. However, the P1 promoter has features of the inducible class (22,23,47). Herein, we demonstrate that even though each of the three *fur* promoters can respond to hypoxia, the P1 promoter is the most sensitive to oxygen deprivation, with an average 3-fold increase (compared to 1.8- and 1.4-fold increases for P1A and P1B, respectively). Analysis of the strong hypoxia-inducible P1 promoter revealed that deletion of the H4- and H5-HRE sites located within the -1221 to -413 (P1-*NheI*) region strongly abolished the response to both hypoxia and HIF-1. The elimination of H4 did not affect P1-*NheI* activity toward HIF-1-forced expression, although the abolition of H5 site completely impaired the response to HIF-1, indicating that the integrity of H5 is crucial for P1 responsiveness to hypoxia. A four tandem repeat of H5-HRE efficiently enhanced minimal thymidine kinase promoter activity toward HIF-1, indicating that this site also has enhancer activity. A common structure of the HRE consists of the core HIF-1 consensus binding sequence

(HBS), 5'-(A/G)(C/T)GTG-3', located upstream of an imperfect inverted repeat, 5'-CAC(A/G)(T/C)-3', called HIF-1 ancillary sequence (HAS), with a spacing of 8 or 9 nt between the HBS and HAS, features crucial for its activity. This is the case for many HIF-1-regulated genes including erythropoietin, VEGF, and Glut-1 (37). Analysis of the H5-HRE site of the *fur* P1 sequence indicated that it is constituted of both HBS and HAS sequences (5'-**GCGTGGTGGCTCACGC**-3'), identical to the Glut-1 HRE (5'-**GCGTGCCGTCTGACACGC**-3') , with the exception of a 6 nt spacing instead of 8 nt between the HAS and the HBS sites (37). In EMSA, a probe containing only the HBS site of H5-HRE, failed to interact with HIF-1 presents in nuclear extracts of hypoxic HepG2 cells. Therefore, as observed for other hypoxia-regulated genes, the *fur* gene requires both the HBS and HAS sites for HIF-1 binding and transactivation. Even though the spacing between the HAS and HBS does not meet the known requirements for HIF-1 binding, it is efficiently transactivated by HIF-1, suggesting that spacing constraints are probably not as critical as previously thought.

The proprotein convertase furin shares a similarity of cleavage site specificity with the 6 other members of the human proprotein convertases family, and consequently, redundancy in substrate processing often occurs (15). Most of the angiogenic/tumorigenic factors requiring bioactivation are processed within the constitutive secretory pathway, where the greatest part of the converting activity is achieved by furin, PACE-4, PC5/PC6 and PC-7 (24). Since an increased expression in PACE-4 and PC7 mRNAs was previously observed in different cancer types (18,57,58), and since both of these convertases are expressed along with furin in HepG2 cells (59), we analyzed the impact of hypoxia on their expression. Although furin expression was dramatically increased upon



oxygen deprivation, PACE-4 and PC7 mRNA levels were only slightly modulated indicating that hypoxia-induced expression is not extended to all human proprotein convertase family members. Nucleotide analysis of the 5'-flanking region of the human PACE-4 and PC7 genes demonstrated the absence of TATA and CAAT elements, promoter features characteristic of housekeeping genes (60,61). However, the PACE-4 promoter contains putative binding sites for several transcription factors such as AP-1, GHF-1 (growth hormone factor-1), and CREB (cyclic AMP response element binding protein) and was shown to be regulated by the growth factor, PDGF-BB (62). Further analysis of the cloned promoter portions for each of these convertases revealed the absence of a canonical HRE in PACE-4 and PC7 genes. Although several transcription factors have been reported to be activated in hypoxia, such as NK- $\kappa$ B and AP-1 (63), HIF-1 was repetitively demonstrated to be the main regulator of the mammalian adaptative response to low oxygen tension. Therefore, the observed absence of HRE consensus HIF-1 binding sites may explain the lack of significant hypoxic response.

The hypoxia/HIF-1-dependent increase in furin gene expression was found to be involved in the increased bioavailability of angiogenic/tumorigenic mediators as exemplified by the metalloproteinase MT1-MMP and the growth factor TGF $\beta$ . Both mediators are well characterized furin substrates that have been shown to profoundly affect many aspects of tumor progression. MT1-MMP, through proteolytic events, regulates various cellular functions, including ECM turnover, promotion of cell migration and invasion. MT1-MMP acts either through direct degradation of ECM components or indirectly by activating pro-MMP2 (55). In addition, these metalloproteases are involved in the construction of the

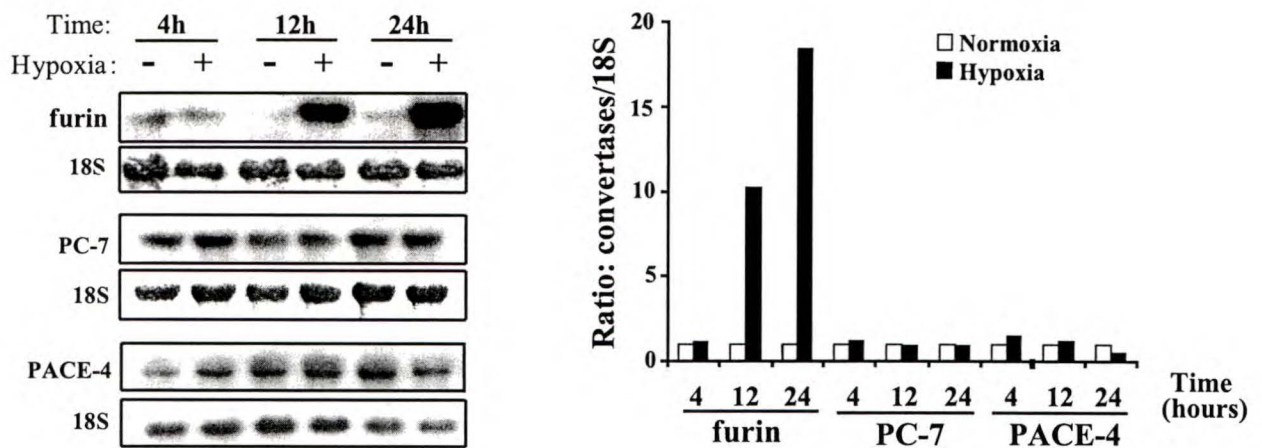
vascular tubular network, in part, through the release or the activation of growth factors (64,65). TGF $\beta$ 1, in turn, creates a favorable environment for tumor establishment by repressing immune surveillance, inducing the production of potent angiogenic factors such as VEGF and bFGF, and by increasing the production of ECM proteases (66,67), which promotes tumor cell invasion and migration. In addition to TGF $\beta$  and MT1-MMP, the multiplicity of other established furin substrates involved in cell growth and survival (IGFR-1, PDGF, HGF) (8,14,68), cell invasion (E-cadherin, integrins) (3,13), and angiogenesis (VEGF-c) (69), support the contention that the regulation of furin activity within hypoxic/HIF1 expressing zones of tumors could profoundly impact the course of tumor growth, invasion and metastasis in a detrimental manner (Figure 8).

The endoproteinase furin is considered to be the most important proprotein convertase of the constitutive secretory pathway, with an essential role in embryogenesis, hemostasis, and various diseases, through the proteolytic maturation of a diverse collection of proprotein substates including growth factors and their receptors. Among them, IGF-1, HGF and PDGF have been shown to increase HIF-1 $\alpha$  levels in various cell types (44,70,71). In addition, inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ , which is released from membranes by the furin substrate TACE/ADAM17 (72), induce HIF-1 activity in normoxic conditions (73,74). These observations suggest that furin regulation by HIF-1 may be a more generalized phenomenon that could apply to other cellular contexts including inflammatory condition where furin activity was shown to be upregulated (42).

**Table I: Measure of bioactive TGF $\beta$ 1 from hypoxia-stimulated Hepa-1 c1c7 and c4 cells**

Experiments	Bioactive TGF $\beta$ (ng/ml)					
	HIF-1-proficient c1c7			HIF-1-deficient C4		
	N	H	hypoxic increase	N	H	hypoxic increase
1	2.82	4.61	63%	3.45	2.91	-
2	2.14	4.97	132%	3.30	3.31	-

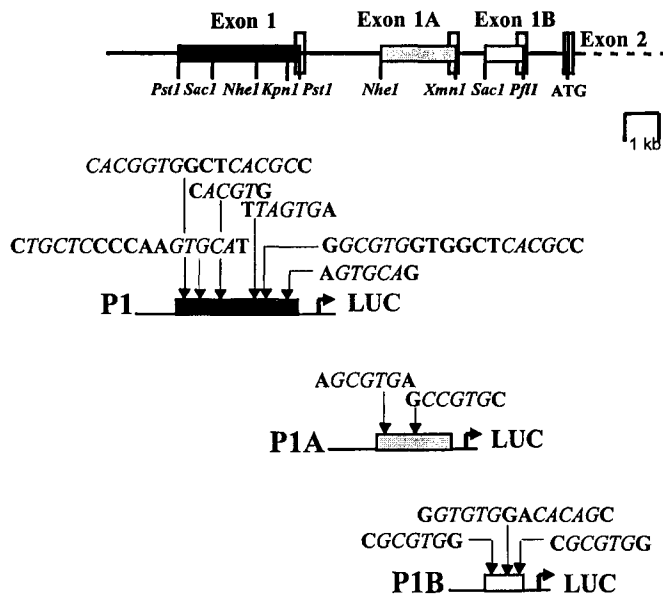
Hepa-1 c1c7 and c4 cells were infected with control (GFP expressing virus) or TGF $\beta$ 1 expressing adenovirus. Following a 16 h exposition to normoxic or hypoxic conditions, cell supernatants were harvested, heat-activated (80°C, 5 min) and assayed for bioactive TGF $\beta$ 1 as described in Methods. Data are expressed as TGF $\beta$ 1 ng/ml of cell culture medium.



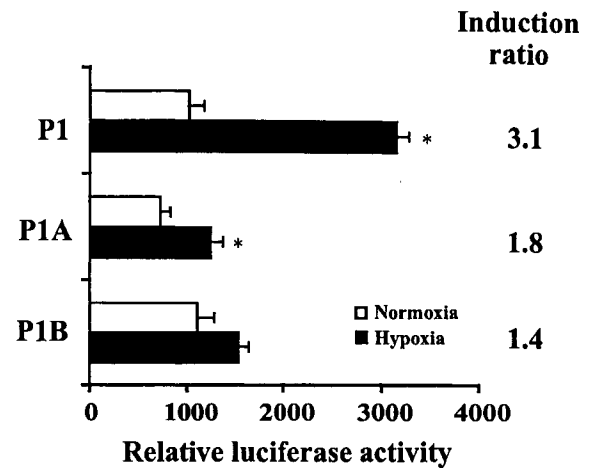
**Figure 1: Expression of furin in hypoxic conditions.**

Kinetics of *fur*, PACE-4 and PC7 mRNA accumulation. HepG2 cells were cultured in normoxia (21 % O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for various time-periods as indicated. Total mRNA (5 µg/lane) was probed with specific furin, PACE-4, and PC7 rat riboprobes. A 18S probe was used as an internal control. The autoradiogram and the densitometry ratio of each convertase/18S (controls set to 1) are represented

A)



B)



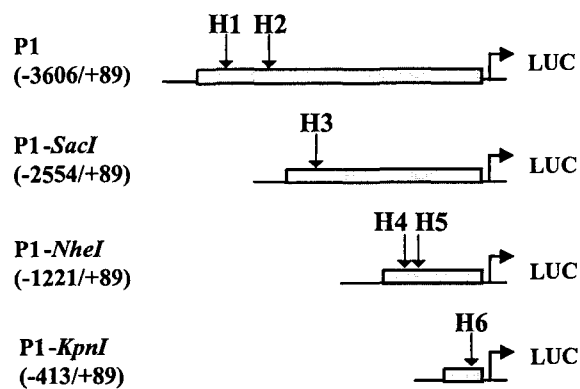
**Figure 2: Effect of hypoxia on *fur* P1, P1A and P1B promoter activity.**

(A) Schematic representation of localization and sequence of the HRE motifs present in the 5' noncoding exons 1, 1A and 1B of the human *fur* gene. (B) Transient transfection of HepG2 cells with 2  $\mu$ g/well of pGL2-Basic (promoterless vector), pGL2-P1, pGL2-P1A or pGL2-P1B promoter constructs. Cells were incubated overnight in normoxic or hypoxic conditions before luciferase activity measurement. The induction ratio of the luciferase activity by hypoxia is indicated for each luciferase promoter construct. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM, n=3, \*p< 0.05, compared to normoxic control.

**Figure 3: Functional analysis of *fur* P1 5'-deletion constructs.**

(A) Schematic representation of putative HIF-1 recognition sequences present in *fur* P1 promoter fragments shortened in 5' accordingly to endogenous *SacI*, *NheI*, or *KpnI* restriction sites. Base positions are numbered relative to the TATA box. (B) HepG2 cells were transiently transfected with 2 µg/well *fur* P1, P1-*SacI*, P1-*NheI*, or P1-*KpnI* constructs. Cells were cultured 16 h in normoxia or hypoxia before luciferase activity measurement. The induction ratio of the luciferase activity by hypoxia is indicated for each luciferase promoter construct. Data are expressed as the mean ± SEM, n=9. (C) HepG2 cells were transiently cotransfected with 2 µg/well *fur* P1, P1-*SacI*, P1-*NheI*, or P1-*KpnI* constructs and either 1 µg/well of each vectors encoding HIF-1α and HIF-1β or 2 µg/well empty pCDNA3 vector. Cells were cultured 16 h before luciferase activity measurement. The induction ratio of the luciferase activity by HIF-1 is indicated for each luciferase promoter construct. Data are expressed as the mean ± SEM, n=3.

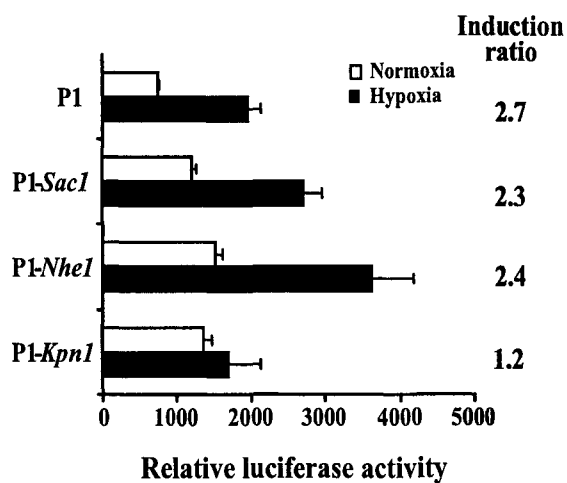
A)



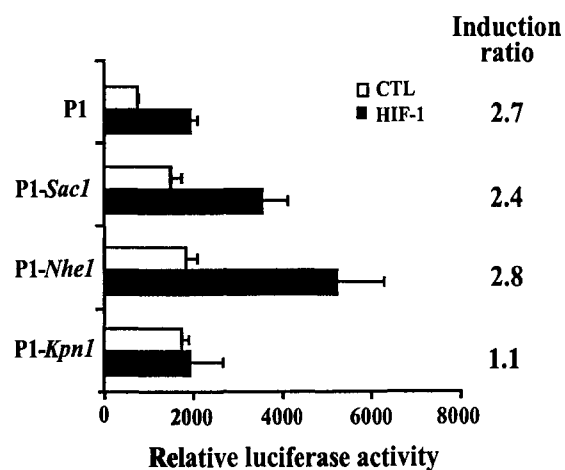
Sites	HRE
H1	5'-GGC <u>ACGGTGGCTCACGCCTGT</u> -3'
H2	5'-GTCT <u>GCTCCCAAGTGCATAAG</u> -3'
H3	5'-GCC <u>ACGTGCAGCCCCTTGAGC</u> -3'
H4	5'-GTTT <u>AGTGACTAGGGATGCGA</u> -3'
H5	5'-CGGG <u>CGTGGTGGCTCACGCCT</u> -3'
H6	5'-TAAGTGCAGACTCACCCCAATA-3'

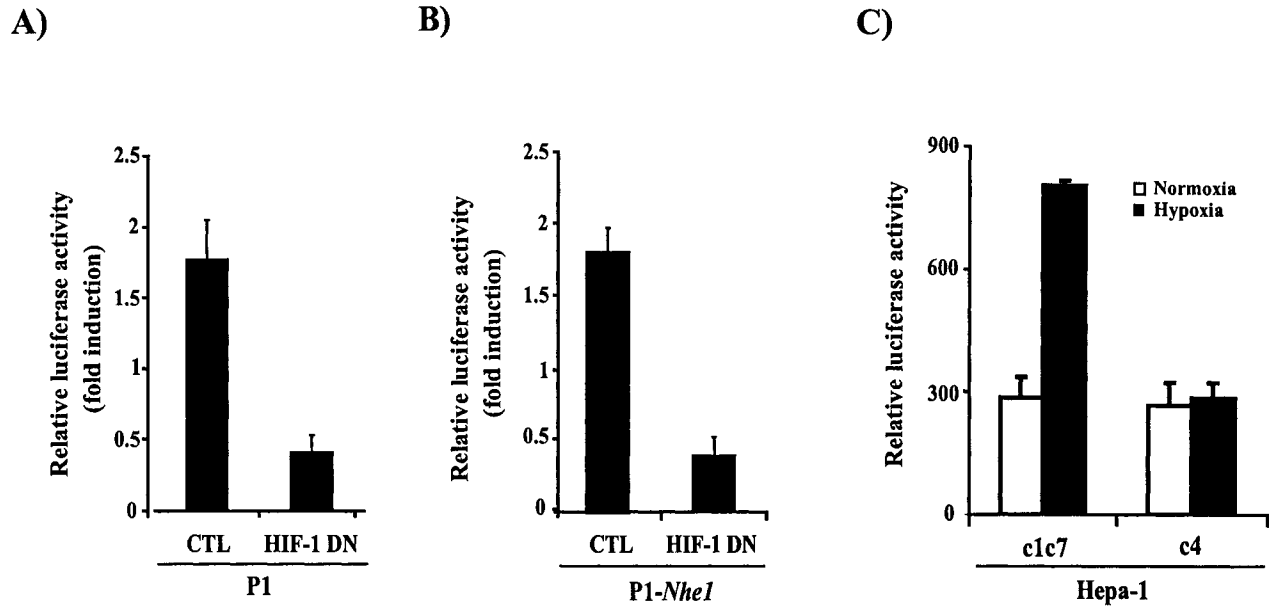
HBS      HAS

B)



C)





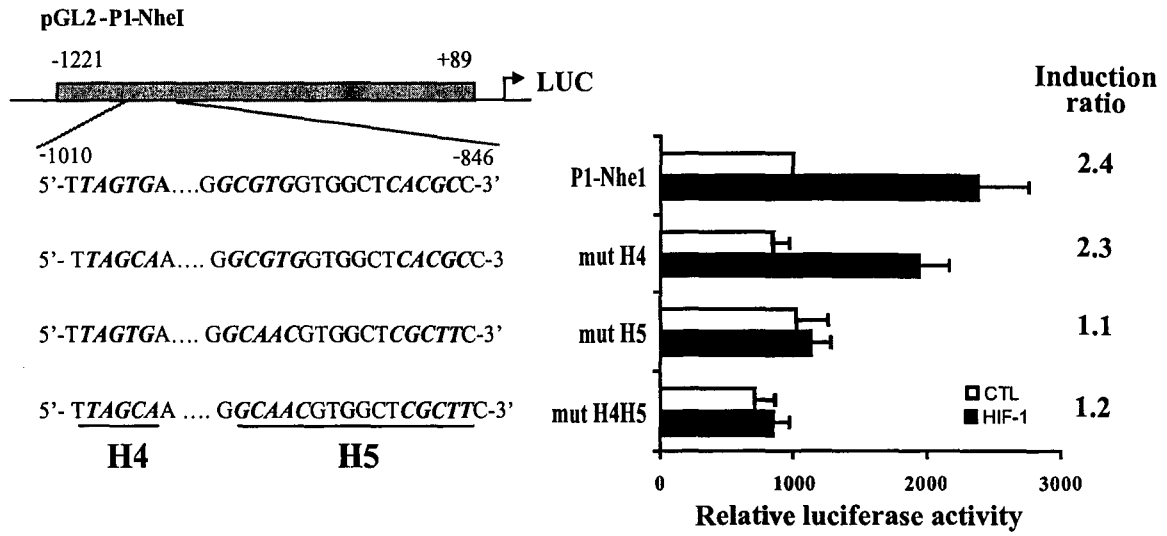
**Figure 4: Regulation of *fur* P1 and P1-*Nhe1* promoters by hypoxia and HIF-1.** HepG2 cells were transiently cotransfected with 2  $\mu$ g/well (A) *fur* P1 or (B) P1-*Nhe1* constructs and 2  $\mu$ g/well pCDNA3-HIF-1 DN or empty pCDNA3 vector (CTL). Cells were cultured overnight in hypoxia or normoxia before luciferase activity measurement. Results are expressed as fold-increase relative to the normoxic control cells. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM, n=4 for A and n=6 for B. (C) Hepa-1 c1c7 and c4 cell lines were transiently transfected with 2  $\mu$ g/well *fur* P1-Luc construct and incubated overnight in normoxia or hypoxia before luciferase activity measurement. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM, n=3.



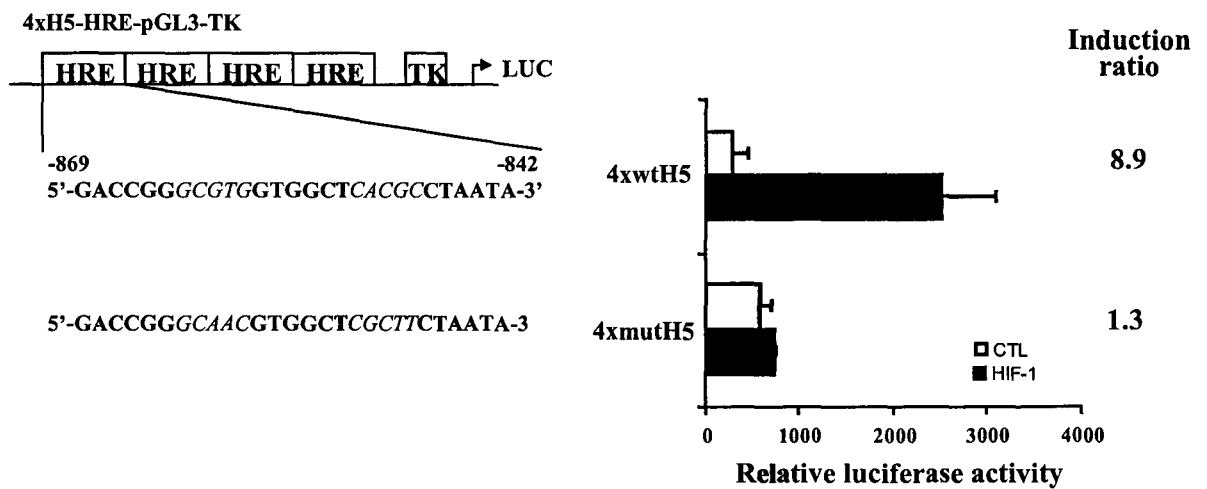
**Figure 5: Functional analysis of HIF-1-binding sites within *fur* P1-*Nhe1* promoter region.**

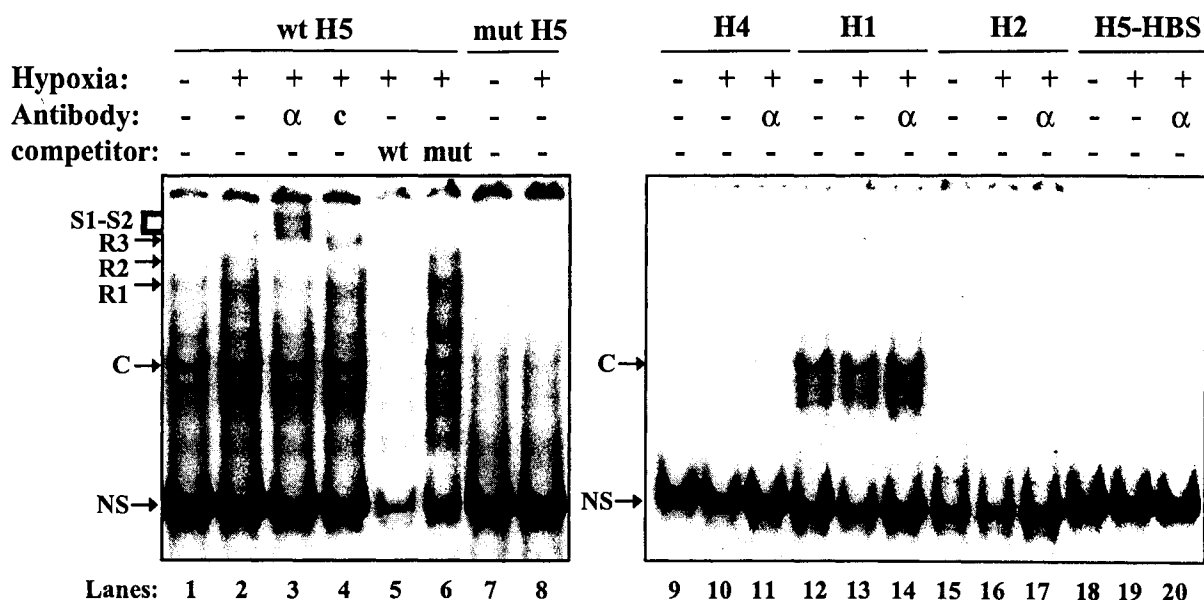
(A) HepG2 cells were transiently cotransfected with 2  $\mu\text{g}/\text{well}$  of WT P1-*Nhe1*, or mutated P1-*Nhe1*H4 MUT, P1-*Nhe1*H5 MUT, P1-*Nhe1*H4/H5 MUT constructs and either 1  $\mu\text{g}/\text{well}$  of each pCDNA3-HIF-1 $\alpha$  and pCDNA3-HIF-1 $\beta$  or 2  $\mu\text{g}/\text{well}$  of the empty pCDNA3 vector, for a total of 4  $\mu\text{g}$  plasmids/ $\text{well}$ . Cells were incubated 16 h before luciferase activity measurement. The induction ratio of the luciferase activity by HIF-1 is indicated for each luciferase promoter construct. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM, n=2 to 5. (B) Four tandem oligonucleotides containing the wt or mutated H5 HBS-HAS sequences from the *fur* P1 promoter were cloned into a luciferase construct containing the minimal thymidine kinase promoter (pGL3-TK-Luc) to generate the plasmids 4xwtH5-HRE-pGL3-TK or 4xmutH5-HRE-pGL3-TK, respectively. Two  $\mu\text{g}/\text{well}$  of the resulting constructs or the pGL3-TK-Luc were transiently transfected with either 1  $\mu\text{g}/\text{well}$  of each pCDNA3-HIF-1 $\alpha$  and pCDNA3-HIF-1 $\beta$  or 2 $\mu\text{g}/\text{well}$  of the empty pCDNA3 vector into HepG2 cells. Cells were cultured 16 h before luciferase activity measurement. The induction ratio of the luciferase activity by HIF-1 is indicated for each luciferase promoter construct. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM, n=2.

A)



B)





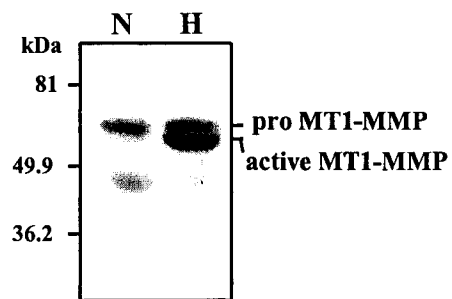
**Figure 6: Analysis of HIF-1 binding to HREs within *fur* P1 promoter.**

HepG2 cells were cultured 16 h in normoxia or hypoxia prior to the nuclear extracts preparation. The nuclear extracts were incubated with the wt H5 radiolabeled probe (wt H5, lanes 1-6). The specificity of complex formation was tested by the inclusion of 100-fold excess of unlabeled competitors in the binding buffer (cold probe (wt), lane 5; cold mutated H5 probe (mut), lane 6), by including a specific anti-HIF-1 $\alpha$  antibody ( $\alpha$ , lane 3) or an isotype-matched control antibody (c, lane 4), or by the use of radiolabeled mut H5 probe in EMSA (lanes 7-8). Radiolabeled probes containing only the HBS site of H5 (lanes 18-20) or including other HREs sequences within *fur* P1 promoter were also tested for their binding to HIF-1 (H1, lanes 12-14; H2, lanes 15-17; and H4, lanes 9-11). S1 and S2 indicate supershifted complexes; C, constitutive band; R1, R2 and R3, HIF-1 binding complexes and NS, nonspecific band.

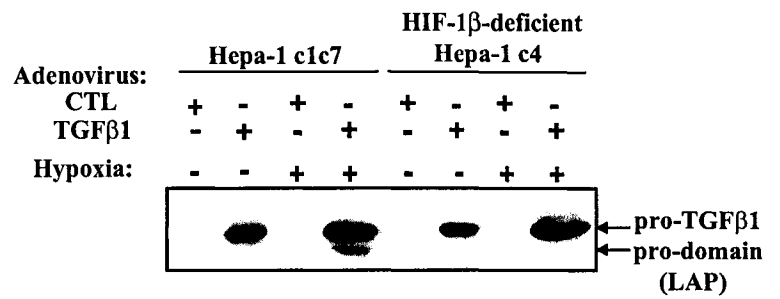
**Figure 7: Biological impact of hypoxia/HIF-1- induced furin gene expression**

Western blot analysis of furin processing of MT1-MMP and TGF $\beta$ 1. A) HepG2 cells were cultured in normoxia (N) or hypoxia (H) for 16 h. B) Hepa-1 c1c7 and c4 cells were infected with control adenovirus (expressing GFP only) or TGF $\beta$ 1 expressing adenovirus at a final MOI of 200 and cultured in normoxia or hypoxia for 16 h. Cell lysates were separated on 7.5% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes. Immunoblotting was performed using anti-MT1-MMP or anti-LAP antibodies. Three immunoreactive MT1-MMP bands can be visualized corresponding to the pro form (66k Da), the active form (60 kDa) and a degradation form ( $\approx$  45 kDa). Anti-LAP immunoblotting revealed two bands corresponding to the pro-TGF $\beta$ 1 (55 kDa) and the pro-domain (44 kDa). C) In vitro invasion was assessed in Boyden chambers using filters coated with type IV collagen. Eighty thousand parental HT1080 cells or stable transfected cells with either the furin inhibitor AT-PDX (PDX-A, PDX-B and PDX-C) or the empty pcDNA3 vector (CTL-1 and CTL-2) were allowed to migrate under normoxic or hypoxic conditions for 8 hours. Northern blot analysis was performed to confirm the expression of furin inhibitor AT-PDX mRNA transcripts in samples from cells cultured under normoxic or hypoxic conditions. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM a representative experiment out of three different ones is shown.

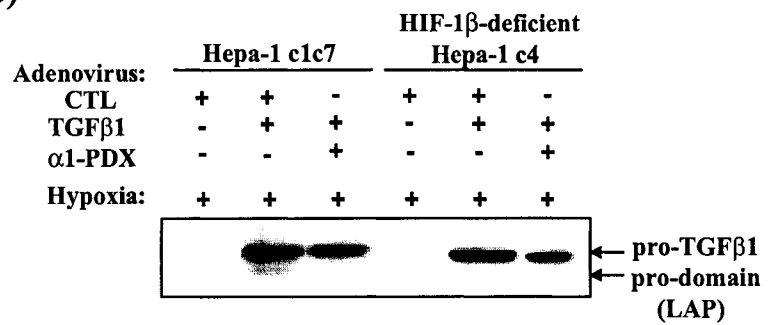
A)

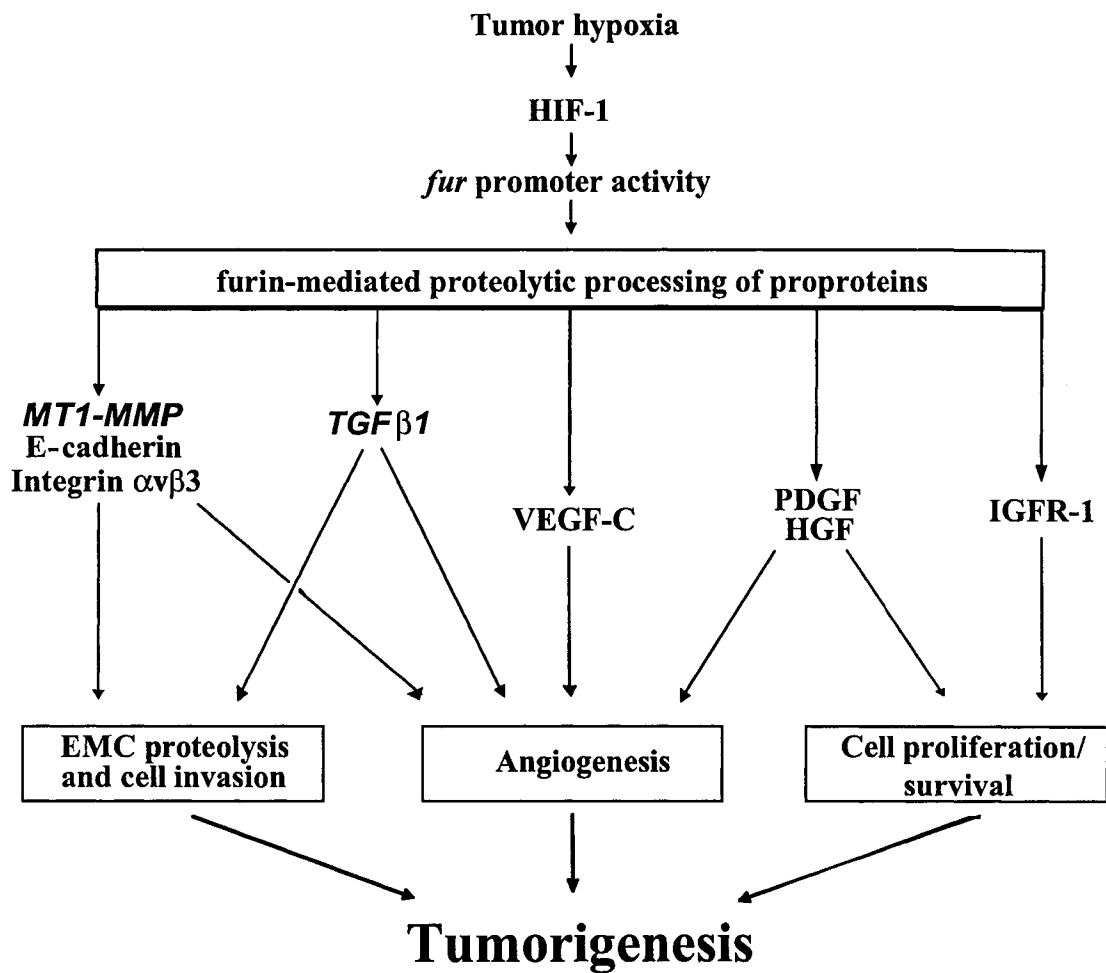


B)



C)





**Figure 8: Proposed impacts of *fur* hypoxia-induced expression.**

The proposed events depicted here are relative to tumorigenesis but furin implication in other pathological processes is not excluded. Furin is known to mature a broad range of growth factors, metalloproteinases and adhesion molecules, some of which expression is increased upon hypoxia. Increased intracellular levels of furin in solid tumor hypoxic regions will impact the bioactivation of multiple tumorigenic/angiogenic factors and favor tumor progression

## REFERENCES:

1. Semenza, G. (2002) *Biochem Pharmacol* **64**, 993-998
2. Wenger, R. H. (2002) *Faseb J* **16**, 1151-1162
3. Posthaus, H., Dubois, C. M., and Muller, E. (2003) *FEBS Lett* **536**, 203-208
4. Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P., and Semenza, G. L. (2003) *Cancer Res* **63**, 1138-1143
5. Patel, B., Khaliq, A., Jarvis-Evans, J., McLeod, D., Mackness, M., and Boulton, M. (1994) *Biochem Mol Biol Int* **34**, 639-644
6. Gleadle, J. M., Ebert, B. L., Firth, J. D., and Ratcliffe, P. J. (1995) *Am J Physiol* **268**, C1362-1368
7. Dubois, C. M., Laprise, M. H., Blanchette, F., Gentry, L. E., and Leduc, R. (1995) *J Biol Chem* **270**, 10618-10624
8. Siegfried, G., Khatib, A. M., Benjannet, S., Chretien, M., and Seidah, N. G. (2003) *Cancer Res* **63**, 1458-1463
9. Duguay, S. J., Lai-Zhang, J., and Steiner, D. F. (1995) *J Biol Chem* **270**, 17566-17574
10. Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., and Shimizu, S. (1989) *Nature* **342**, 440-443
11. Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K., and Seiki, M. (1996) *FEBS Lett* **393**, 101-104
12. Yana, I., and Weiss, S. J. (2000) *Mol Biol Cell* **11**, 2387-2401

13. Lissitzky, J. C., Luis, J., Munzer, J. S., Benjannet, S., Parat, F., Chretien, M., Marvaldi, J., and Seidah, N. G. (2000) *Biochem J* **346 Pt 1**, 133-138
14. Khatib, A. M., Siegfried, G., Prat, A., Luis, J., Chretien, M., Metrakos, P., and Seidah, N. G. (2001) *J Biol Chem* **276**, 30686-30693
15. Seidah, N. G., and Chretien, M. (1997) *Curr Opin Biotechnol* **8**, 602-607
16. Steiner, D. F. (1998) *Curr Opin Chem Biol* **2**, 31-39
17. Bassi, D. E., Mahloogi, H., Al-Saleem, L., Lopez De Cicco, R., Ridge, J. A., and Klein-Szanto, A. J. (2001) *Mol Carcinog* **31**, 224-232
18. Cheng, M., Watson, P. H., Paterson, J. A., Seidah, N., Chretien, M., and Shiu, R. P. (1997) *Int J Cancer* **71**, 966-971
19. Mercapide, J., Lopez De Cicco, R., Bassi, D. E., Castresana, J. S., Thomas, G., and Klein-Szanto, A. J. (2002) *Clin Cancer Res* **8**, 1740-1746
20. Schalken, J. A., Roebroek, A. J., Oomen, P. P., Wagenaar, S. S., Debruyne, F. M., Bloemers, H. P., and Van de Ven, W. J. (1987) *J Clin Invest* **80**, 1545-1549
21. Khatib, A. M., Siegfried, G., Chretien, M., Metrakos, P., and Seidah, N. G. (2002) *Am J Pathol* **160**, 1921-1935
22. Ayoubi, T. A., Creemers, J. W., Roebroek, A. J., and Van de Ven, W. J. (1994) *J Biol Chem* **269**, 9298-9303
23. Laprise, M. H., Grondin, F., Cayer, P., McDonald, P. P., and Dubois, C. M. (2002) *Blood* **100**, 3578-3587
24. Dubois, C. M., Blanchette, F., Laprise, M. H., Leduc, R., Grondin, F., and Seidah, N. G. (2001) *Am J Pathol* **158**, 305-316
25. Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., and Maity, A. (2001) *J Biol Chem* **276**, 9519-9525



26. Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., and Semenza, G. L. (1996) *Mol Cell Biol* **16**, 4604-4613
27. Semenza, G. L., and Wang, G. L. (1992) *Mol Cell Biol* **12**, 5447-5454
28. Ebert, B. L., Firth, J. D., and Ratcliffe, P. J. (1995) *J Biol Chem* **270**, 29083-29089
29. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5510-5514
30. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) *Science* **292**, 468-472
31. Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., and Ratcliffe, P. J. (1999) *Nature* **399**, 271-275
32. Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L. (1999) *J Biol Chem* **274**, 6519-6525
33. Salceda, S., and Caro, J. (1997) *J Biol Chem* **272**, 22642-22647
34. Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H. F. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7987-7992
35. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G., Jr. (2001) *Science* **292**, 464-468
36. Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., and Semenza, G. L. (1996) *J Biol Chem* **271**, 17771-17778
37. Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashima, Y., Hashimoto, K., D'Acquisto, F., Makuuchi, M., and Esumi, H. (2001) *J Biol Chem* **276**, 2292-2298

38. Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W. B., Semenza, G. L., and Simons, J. W. (1999) *Cancer Res* **59**, 5830-5835
39. Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Harris, A. L. (2000) *Am J Pathol* **157**, 411-421
40. Beasley, N. J., Leek, R., Alam, M., Turley, H., Cox, G. J., Gatter, K., Millard, P., Fuggle, S., and Harris, A. L. (2002) *Cancer Res* **62**, 2493-2497
41. Chomczynski, P. (1993) *Biotechniques* **15**, 532-534, 536-537
42. Blanchette, F., Day, R., Dong, W., Laprise, M. H., and Dubois, C. M. (1997) *J Clin Invest* **99**, 1974-1983
43. Blanchette, F., Rivard, N., Rudd, P., Grondin, F., Attisano, L., and Dubois, C. M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 33986-33994
44. Richard, D. E., Berra, E., and Pouyssegur, J. (2000) *J Biol Chem* **275**, 26765-26771
45. Richard, D. E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D., and Pouyssegur, J. (1999) *J Biol Chem* **274**, 32631-32637
46. Langlois, M. F., Zanger, K., Monden, T., Safer, J. D., Hollenberg, A. N., and Wondisford, F. E. (1997) *J Biol Chem* **272**, 24927-24933
47. Blanchette, F., Rudd, P., Grondin, F., Attisano, L., and Dubois, C. M. (2001) *J Cell Physiol* **188**, 264-273
48. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983) *Nucleic Acids Res* **11**, 1475-1489
49. McDonald, P. P., Fadok, V. A., Bratton, D., and Henson, P. M. (1999) *J Immunol* **163**, 6164-6172

50. Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1995) *J Biol Chem* **270**, 1230-1237
51. Wood, S. M., Gleadle, J. M., Pugh, C. W., Hankinson, O., and Ratcliffe, P. J. (1996) *J Biol Chem* **271**, 15117-15123
52. Lok, C. N., and Ponka, P. (2000) *J Biol Chem* **275**, 24185-24190
53. Miyazaki, K., Kawamoto, T., Tanimoto, K., Nishiyama, M., Honda, H., and Kato, Y. (2002) *J Biol Chem* **277**, 47014-47021
54. Firth, J. D., Ebert, B. L., and Ratcliffe, P. J. (1995) *J Biol Chem* **270**, 21021-21027
55. Sounni, N. E., Janssen, M., Foidart, J. M., and Noel, A. (2003) *Matrix Biol* **22**, 55-61
56. Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, A. J., and Thomas, G. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7293-7298
57. Hubbard, F. C., Goodrow, T. L., Liu, S. C., Brilliant, M. H., Basset, P., Mains, R. E., and Klein-Szanto, A. J. (1997) *Cancer Res* **57**, 5226-5231
58. Rovere, C., Barbero, P., Maoret, J. J., Laburthe, M., and Kitabgi, P. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **246**, 155-159
59. Mori, K., Imamaki, A., Nagata, K., Yonetomi, Y., Kiyokage-Yoshimoto, R., Martin, T. J., Gillespie, M. T., Nagahama, M., Tsuji, A., and Matsuda, Y. (1999) *J Biochem (Tokyo)* **125**, 627-633
60. Tsuji, A., Hine, C., Tamai, Y., Yonemoto, K., Mori, K., Yoshida, S., Bando, M., Sakai, E., Akamatsu, T., and Matsuda, Y. (1997) *J Biochem (Tokyo)* **122**, 438-452
61. Goodge, K. A., Thomas, R. J., Martin, T. J., and Gillespie, M. T. (1998) *Biochem J* **336 ( Pt 2)**, 353-359
62. Bando, M., Matsuoka, A., Tsuji, A., and Matsuda, Y. (2002) *J Biochem (Tokyo)* **132**, 127-134

63. Faller, D. V. (1999) *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**, 74-84
64. Jeong, J. W., Cha, H. J., Yu, D. Y., Seiki, M., and Kim, K. W. (1999) *Angiogenesis* **3**, 167-174
65. Sasaki, K., Hattori, T., Fujisawa, T., Takahashi, K., Inoue, H., and Takigawa, M. (1998) *J Biochem (Tokyo)* **123**, 431-439
66. Pepper, M. S., Belin, D., Montesano, R., Orci, L., and Vassalli, J. D. (1990) *J Cell Biol* **111**, 743-755
67. Sounni, N. E., Devy, L., Hajitou, A., Frankenne, F., Munaut, C., Gilles, C., Deroanne, C., Thompson, E. W., Foidart, J. M., and Noel, A. (2002) *Faseb J* **16**, 555-564
68. Zhang, Y. W., Su, Y., Volpert, O. V., and Vande Woude, G. F. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12718-12723
69. Siegfried, G., Basak, A., Cromlish, J. A., Benjannet, S., Marcinkiewicz, J., Chretien, M., Seidah, N. G., and Khatib, A. M. (2003) *J Clin Invest* **111**, 1723-1732
70. Tacchini, L., Dansi, P., Matteucci, E., and Desiderio, M. A. (2001) *Carcinogenesis* **22**, 1363-1371
71. Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y. D., Ellis, L. M., and Semenza, G. L. (2002) *J Biol Chem* **277**, 38205-38211
72. Srour, N., Lebel, A., McMahon, S., Fournier, I., Fugere, M., Day, R., and Dubois, C. M. (2003) *FEBS Lett* **554**, 275-283
73. Zhou, J., Schmid, T., and Brune, B. (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 2216-2225
74. Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., and Jelkmann, W. (1999) *Blood* **94**, 1561-1567

## **CHAPITRE III**

**Le TGF $\beta$ 1 induit l'expression du HIF-1 via deux mécanismes impliquant l'inhibition de l'expression de la PHD2 et l'augmentation de la transcription du HIF-1 $\alpha$ .**

Stéphanie McMahon, Martine Charbonneau, Sébastien Grandmont et Claire M. Dubois

Article soumis au journal *The Journal of Biological Chemistry* en janvier 2005

## **RÉSUMÉ :**

Le facteur de transcription inductible à l'hypoxie-1 (HIF-1) joue un rôle central dans plusieurs processus pathologiques via l'induction de l'expression de gènes spécifiques incluant le VEGF. Tel que son nom l'indique, le HIF-1 est fortement modulé par l'hypoxie. Toutefois, il est connu que d'autres éléments du microenvironnement tumoral et inflammatoire influencent son expression et son activité en condition normale d'oxygène. Parmi ceux-ci, des études récentes indiquent que le TGF $\beta$ 1 augmente l'expression de la sous-unité régulable du HIF-1, le HIF-1 $\alpha$ , ainsi que l'activité de liaison à l'ADN du HIF-1. Dans ce travail, nous démontrons que le TGF $\beta$ 1 agit au niveau de l'accumulation et de l'activité du HIF-1 via deux mécanismes différents. Ces derniers impliquent la synthèse d'ARNm et l'augmentation de la stabilité du HIF-1 $\alpha$ . Nous démontrons, de façon plus particulière, que le TGF $\beta$ 1 diminue, de façon marquée, les niveaux d'ARNm et de protéine encodant la prolyl hydroxylase associée au HIF-1 $\alpha$ , la PHD2, via les voies de signalisation Erk et PI3K. Conséquemment, l'hydroxylation/dégradation du HIF-1 $\alpha$  est inhibée tel que déterminé par la stabilisation du domaine de dégradation dépendant de l'oxygène du HIF-1 $\alpha$  qui contient les prolines ciblées par la PHD2. De plus, lors de l'inhibition de l'enzyme de conversion du TGF $\beta$ 1, la furine, une diminution des niveaux basaux de HIF-1 $\alpha$  et de VEGF a été observée, suggérant que la production endogène de TGF $\beta$ 1 bioactif régit efficacement l'expression de gènes cibles du HIF-1. Cette observation est appuyée par des travaux qui démontrent une diminution de la production de VEGF en réponse au TGF $\beta$ 1 chez des cellules

déficientes en HIF-1 $\alpha$ . Ensemble, nos résultats suggèrent un nouveau mécanisme par lequel un facteur de croissance contrôle la stabilité du HIF-1 $\alpha$  via la régulation des niveaux de la PHD2.

**Contribution de l'étudiante :**

En ce qui concerne le troisième chapitre de cette thèse, Stéphanie McMahon a participé activement à l'écriture de cet article sous la supervision de sa directrice de thèse. L'étudiante a également réalisé toutes les expériences contenues dans ce chapitre à l'exception des travaux présentés à la figure 3B ainsi que le buvardage de type Northern présenté à la figure 6A. En fait, l'analyse par PCR en temps réel des niveaux d'ARNm PHD2 a été réalisée par Martine Charbonneau (figure 3B). Sébastien Grandmont a produit les cellules HT1080 exprimant de façon stable la forme dominante négative du HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ DN) ainsi que le buvardage de type Northern démontrant l'expression du transcrit de HIF-1 $\alpha$ DN (figure 6).

# **TGFβ1 induces HIF-1 through dual mechanisms involving inhibition of PHD2 expression and increase in HIF-1α transcription**

Stephanie McMahon, Martine Charbonneau<sup>1</sup>, Sebastien Grandmont<sup>1</sup> and Claire M. Dubois

<sup>1</sup> these authors have contributed equally to this work.

From the Immunology division,  
Faculty of Medicine,  
Université de Sherbrooke,  
Sherbrooke, Qc, Canada,  
J1H 5N4

Running title: TGFβ1 inhibits PHD2 expression

To whom correspondence should be addressed:

Claire M. Dubois, Ph.D  
Immunology Division,  
Université de Sherbrooke,  
3001, 12<sup>th</sup> north avenue,  
Sherbrooke, Qc, Canada,  
J1H 5N4  
Tel.: (819) 564-5289  
Fax.: (819) 564-5215  
Email: [Claire.M.Dubois@USherbrooke.ca](mailto:Claire.M.Dubois@USherbrooke.ca)

Key words: HIF-1 / transforming growth factor beta-1/ prolyl hydroxylases



## **ABSTRACT:**

The hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) is central to a number of pathological processes through the induction of specific genes such as VEGF. Even though HIF-1 is highly regulated by cellular oxygen levels, other elements of the inflammatory and tumor microenvironment were shown to influence its activity under normal oxygen concentration. Among others, recent studies indicated that TGF $\beta$  increases the expression of the regulatory HIF-1 $\alpha$  subunit, and induces HIF-1 DNA-binding activity. Here, we demonstrate that TGF $\beta$  acts on HIF-1 $\alpha$  accumulation and activity through two mechanisms involving active gene transcription and increased HIF-1  $\alpha$  protein stabilization. In particular, we demonstrate that TGF $\beta$  markedly and specifically decreased both mRNA and protein levels of a HIF-1 $\alpha$ -associated prolyl hydroxylase (PHD), PHD2, through the ERK and PI3K pathways. As a consequence, the hydroxylation/degradation of HIF-1 $\alpha$  was inhibited as determined by impaired degradation of a reporter protein containing the HIF-1 $\alpha$  oxygen-dependent degradation domain bearing the PHD-targeted prolines. Moreover, inhibition of the TGF $\beta$ 1 converting enzyme furin, resulted in decreased basal HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression levels, suggesting that the endogenous production of bioactive TGF $\beta$ 1 efficiently regulates HIF-1-targeted genes. This was reinforced by results from HIF-1 $\alpha$  knock-out or HIF-1 $\alpha$ -inhibited cells that show impairment in VEGF production in response to TGF $\beta$ . Collectively, our findings propose a novel mechanism by which a growth factor controls

HIF-1 stability, and thereby drives the expression of specific genes, through the regulation of PHD2 levels.

## **INTRODUCTION:**

Overexpression of the transcription factor HIF-1 is a hallmark of most cancers and is generally associated with increased tumor growth, angiogenesis and patient mortality (1-4). In xenograft models, tumor growth and angiogenesis are inhibited by the loss of HIF-1 activity and stimulated by HIF-1 $\alpha$  overexpression (5-7). The essential role of HIF-1 in tumor progression is attributed to its dominant role in the regulation of various genes associated with the angiogenic process, cell growth/survival as well as invasion/metastasis. HIF-1 is a heterodimeric transcription factor composed of HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$  subunits, however, the biological activity of HIF-1 is determined by the expression and activity of HIF-1 $\alpha$  (8). Whereas the HIF-1 $\beta$  protein is readily found in all cell types, HIF-1 $\alpha$  is rapidly degraded under conditions of normal oxygen and is thereby virtually undetectable. Under normoxia, oxygen-dependent prolyl hydroxylases modify HIF-1 $\alpha$  and permit its recognition by the von Hippel-Lindau tumor suppressor (VHL) which functions together with elongin B, elongin C and Cullin 2 as an E3 ubiquitin ligase complex that mediates HIF-1 $\alpha$  proteasome-dependent degradation. Under hypoxic conditions, prolyl hydroxylation is inhibited leading to HIF-1 $\alpha$  stabilization (9-12). In mammalian cells, three HIF-1 prolyl hydroxylase isoforms, PHD1, PHD2 and PHD3, have been identified and shown to hydroxylate two proline residues (pro-402/564) within the oxygen-dependent degradation domain (ODDD) of HIF-1 $\alpha$  (13). Using siRNA, it was

demonstrated that, *in vivo*, PHDs display distinct functions and that PHD2 is the critical oxygen sensor controlling the low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia (14).

Based on the strong influence of low oxygen concentration on HIF-1 $\alpha$  stabilization, several studies were conducted to demonstrate a correlation between HIF-1 $\alpha$  expression and hypoxic regions within tumors. However, the reported patterns of HIF-1 $\alpha$  staining were often not consistent with hypoxic regions and expression profiles surprisingly showed homogenous distribution of HIF-1 $\alpha$  within the tumor mass (15,16). More recently, it was proposed that the control points regulating HIF-1 $\alpha$  levels are multiple and depend on the tumor microenvironment. In fact, in addition to hypoxia, other stimuli such as growth factors, hormones and cytokines were demonstrated to induce HIF-1 $\alpha$  accumulation and activity under normal oxygen conditions (17-21). Although little is known about the mechanisms involved, data accumulated so far suggests that these agents act at the level of HIF-1 $\alpha$  gene transcription and/or protein synthesis without affecting prolyl hydroxylase levels or activity (22-25).

Numerous changes that promote tumor progression are observed within the tumor microenvironment. When tumors grow, they produce a wide array of pro-tumorigenic molecules. Among others, many common tumors are known to be associated with enhanced levels of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) (26). This growth factor is overexpressed by tumor cells and is also directly released by infiltrating leukocytes, such as tumor-associated macrophages (TAM), a major component of the inflammatory circuit that participates in tumor growth, angiogenesis and metastasis (27). TGF $\beta$ 1 is well

known to play an important role in the tumorigenic process by enhancing the expression of metalloproteases and angiogenic factors which favor tumor invasion and vascularization (28-33). The pro-angiogenic action of TGF $\beta$ 1 is attributed, in part, to its capacity to induce the expression of the angiogenic factor VEGF, a key gene target of the transcription factor HIF-1 (34-36). Moreover, TGF $\beta$ 1 was shown to regulate the expression of its own converting enzyme furin, a recently identified HIF-1 $\alpha$ -regulated gene, which resulted in augmented processing of the TGF $\beta$ 1 precursor into its bioactive form (37,38). This regulatory cycle is of potential importance in the induction, as well as, in the activation of numerous factors implicated in the pathology of cancer. In fact, in addition to TGF $\beta$ 1, furin is known to mature/activate several pro-tumorigenic molecules such as the metalloprotease MT1-MMP, the growth factors PDGF and IGF as well as the angiogenic factor VEGF-C, some of which are HIF-1-regulated genes (39-43).

Furthermore, among recent advances underlining the contribution of TGF $\beta$ 1 to tumor progression is the finding that this growth factor can influence the accumulation of HIF-1 $\alpha$  in normoxic conditions. Increased HIF-1 $\alpha$  expression levels and DNA-binding activity were observed in HT1080 and in vascular smooth muscle cells stimulated with TGF $\beta$ 1 (18,44). The exact molecular mechanism involved in the HIF-1 $\alpha$  increase remained unexplored. Herein, we demonstrate that TGF $\beta$ 1 induces HIF-1 $\alpha$  accumulation and activity, under normoxic conditions, in tumor cell lines through two mechanisms involving 1) an increase in HIF-1 $\alpha$  transcription and 2) a stabilization of the HIF-1 $\alpha$  subunit. More importantly, this growth factor was found to attenuate HIF-1 $\alpha$  ODDD prolyl hydroxylation, an event associated with a marked and specific decrease of PHD2

prolyl hydroxylase gene and protein expression levels. Therefore, our findings propose a novel mechanism by which an inflammatory and tumor growth factor controls the stability of HIF-1 $\alpha$  through the specific regulation of prolyl hydroxylases.

#### **EXPERIMENTAL PROCEDURES:**

*Materials* - Recombinant human TGF $\beta$ 1 was a generous gift from Dr. Anthony F. Purchio. Actinomycin D was purchased from Merck Frosst (Kirkland, Qc, Canada). PD98059 was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Wortmannin and LY294002 were purchased from BioMol (Plymouth Meeting, PA, USA). SB431542, U0126, CoCl<sub>2</sub> and cycloheximide were purchased from Sigma (Oakville, On, Canada). Rabbit antiserum specific to human HIF-1 $\alpha$  was a generous gift from Dr. Darren Richard (Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu, Qc, Canada). Anti-PHD1, anti-PHD2 and anti-PHD3 antibodies were obtained from Novus Biotechnologies (Littleton, CO, USA). Anti-actin antibody was purchased from Sigma. Decanoyl-RVKR-chloromethylketone (DEC-RVKR) was purchased from Bachem (Torrance, CA, USA).

*Cell culture and transfection* - The hepatoma cell lines HepG2 and HT1080 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA). The wild type and the HIF-1 $\alpha$  knock-out mouse embryonic fibroblasts (MEF) were a generous gift from Dr. Darren Richard. All cell lines were cultured in complete media consisting in Minimal Essential Medium (MEM) (Gibco BRL, Burlington, On, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma) in a humidified 95% air/5% CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. HT1080 were stably transfected with pcDNA3- $\alpha$ 1-PDX vector encoding the furin

inhibitor  $\alpha 1$  anti-trypsin PDX, pcDNA3-HIF-1 $\alpha$ DN vector encoding a dominant-negative form of HIF-1 $\alpha$  or with the control empty vector pcDNA3. Three clones expressing different amounts of  $\alpha 1$ -PDX (PDX-A, PDX-B and PDX-C), one clone expressing a dominant negative form of HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ DN) and one control clone (CTL) were obtained. These cells were maintained in complete media containing 600  $\mu$ g/ml G-418 as a selecting agent. Cells were serum-starved 2 to 3 h prior stimulation with TGF $\beta$ 1.

*Western blot analysis* - HIF-1 $\alpha$ , PHD1, PHD2 and PHD3 were detected by Western blot analysis. Cells were serum starved and stimulated as indicated. Nuclear cell extracts were prepared as previously described (38). Total cell lysates and immunoblotting were performed as previously described (45). The membranes were probed overnight with primary antibodies. The secondary antibody was a peroxidase-conjugated anti-rabbit (Amersham, Baie d'Urfé, QC, Canada). Blots were developed using ECL Western blotting detection reagent (Amersham).

*Northern blot analysis* - Cells were serum-starved and stimulated as indicated. Total cellular RNA was extracted from cells according to the previously described TRI-Reagent protocol (46). Northern blot analysis was performed as previously described using human HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ DN and  $\alpha 1$  anti-trypsin [ $^{32}$ P]-labelled riboprobe (37). 18S was used as an internal control.

*Luciferase assays* - HepG2 cells were transiently transfected by CaPO<sub>4</sub> precipitation technique using a Mammalian Cell Transfection Kit (Specialty Media, Lavallette, NJ,

USA) as previously described (47). Briefly, cells were transfected with 2 µg/well of the previously described PRE-tk-LUC reporter vector or a plasmid encoding CMV-Luc-HIF-1α ODDD, generously provided by Dr. Richard K. Bruick (University of Texas Southwestern Medical Center, Texas, USA) and with pRL-SV Renilla reniformis luciferase expression vector as a control for transfection efficiency (Promega, Madison, WI) (48,49). Twenty hours following transfection, cells were serum-starved 2-3 h prior stimulation. Cell lysates were assayed for luciferase activity using the Dual-Glo luciferase system (Promega). Data are presented as the fold induction ± SEM of normalized relative luciferase units consisting of the ratio of luciferase activity produced by the studied luciferase vectors over *Renilla reniformis* luciferase activity.

*Real time PCR* - HepG2 cells were seeded and the following day they were serum-starved and stimulated with 0 or 5 ng/ml TGFβ1 for the indicated time-periods. Total RNA was isolated using TRI-Reagent protocol as described above. Reverse transcription was achieved using decamer random primers (Ambion). The following primer pairs were selected for PHD2: (forward) 5'- GCACGACACCGGGAAGTT-3', (reverse) 5'- CCAGCTTCCCGTTACAGT-3' and for 18S: (forward) 5'- AGGAATTGACGGAAGGGCAC-3', (reverse) 5'-GTGCAGCCCCGGACATCTAAG-3'. The quantitative Real-Time PCR was performed by Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Kirkland, Qc, Canada). The reaction mixtures containing SYBR Green were generated following the manufacturer's protocol. The cycling program was: initial denaturation at 95°C for 5 min, 40 cycles of amplification with an annealing temperature of 60°C for 45 sec and a final extension at 72°C for 30 sec.

*Measurement of VEGF* - Cells were seeded at 60 000 cells/well in 24 well plates and serum starved 3-4h prior overnight stimulation with 0 or 5 ng/ml of TGF $\beta$ 1. VEGF concentrations in conditioned media were measured using commercial Quantikine mouse VEGF immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or human VEGF colorimetric ELISA kit (Pierce, Rockford, IL, USA).



## RESULTS:

*TGF $\beta$ 1 induces HIF-1 $\alpha$  accumulation and activity in normoxic conditions.* There is considerable evidence indicating that during tumor growth, large amounts of TGF $\beta$ 1 are found within the tumor microenvironment and contribute to tumor progression (26). TGF $\beta$  is described as a pro-angiogenic molecule, owing in part to its capacity to induce the expression of VEGF, a key target of the transcription factor HIF-1 (34-36). Following these observations, we first tested the ability of TGF $\beta$ 1 to regulate HIF-1 $\alpha$  expression, the HIF-1 regulatory subunit. Results expressed in Figure 1A indicate that HIF-1 $\alpha$  nuclear accumulation is increased up to 12 fold following a 6 h stimulation with 0.5 and 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 when compared to untreated cells, while stimulation with 10 ng/ml resulted in a lesser effect. In further experiments we therefore used 5 ng/ml TGF $\beta$ 1, a concentration that corresponds to physiological levels found within tumor and inflammatory microenvironments (50,51). Kinetics of HIF-1 $\alpha$  protein accumulation in response to TGF $\beta$ 1 is shown in Figure 1B. Results indicate that an increase in HIF-1 $\alpha$  nuclear expression was detected at 4 h, with maximum levels obtained at 8 and 16 h following stimulation.

To determine if TGF $\beta$ 1-induced HIF-1 $\alpha$  is transcriptionally active, we measured the capacity of HIF-1 to activate the transcription of a luciferase reporter gene driven by 3 repeats of a specific hypoxia-responsive element (HRE) retrieved from the erythropoietin gene (PRE-tk-LUC)(49,52). As presented in Figure 1C, TGF $\beta$ 1 treatment resulted in a 2.4 fold-increase in HIF-1-inducible luciferase reporter activity, which indicates that TGF $\beta$ 1 induced-HIF-1 can efficiently transactivate HRE *cis*-acting elements.

***TGF $\beta$ 1 induces HIF-1 $\alpha$  gene transcription and protein stability.*** Previous studies have indicated that the increased transcription of the HIF-1 $\alpha$  gene plays a role in HIF-1 $\alpha$  protein induction by nonhypoxic stimuli such as LPS, HGF and angiotensin II (22,24,53). To evaluate whether a similar mechanism is involved in the induction of HIF-1 $\alpha$  by TGF $\beta$ 1, HepG2 cells were stimulated with TGF $\beta$ 1 and their HIF-1 $\alpha$  mRNA was analyzed by Northern blotting. As depicted in Figure 2A, HIF-1 $\alpha$  mRNA was increased following a 6 h treatment with 0.5 and 5 ng/ml TGF $\beta$ 1, although a lower effect was observed using 10 ng/ml. This concentration-dependent response correlates with the accumulation of HIF-1 $\alpha$  protein presented in Figure 1A. Next, to determine whether the increase in HIF-1 $\alpha$  mRNA was directly or indirectly transcriptionally regulated, cells were pretreated with a potent inhibitor of mRNA synthesis, actinomycin D, 30 min prior to stimulation with 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 for 6 h. As presented in Figure 2B, pretreatment with actinomycin D inhibited in a concentration-dependent manner TGF $\beta$ 1-induced HIF-1 $\alpha$  mRNA. Consequently, our data suggest that transcriptional mechanism(s) are involved in the regulation of HIF-1 $\alpha$  by TGF $\beta$ 1.

To determine if the observed accumulation of the HIF-1 $\alpha$  protein correlates in time with the induction of HIF-1 $\alpha$  mRNA, HepG2 cells were stimulated with 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 for time-periods ranging between 4 to 16 h. Results presented in Figure 2C indicate a marked induction of HIF-1 $\alpha$  mRNA at 8 h followed by a decrease at 16 h. Therefore, the transcriptional regulation of HIF-1 $\alpha$  gene by TGF $\beta$ 1 seems to be delayed compared to the protein expression (Fig. 2C compared to Fig. 1B). Consequently, in addition to transcriptional regulation of the HIF-1 $\alpha$  gene, other mechanisms would contribute to the accumulation of HIF-1 protein in response to TGF $\beta$ 1.

The regulation of protein stability is a key event in controlling HIF-1 $\alpha$  accumulation since the protein is subjected to rapid degradation under normoxic conditions (54,55). Therefore, we next examined whether TGF $\beta$ 1 affects HIF-1 $\alpha$  half-life. For this, cells were incubated for 6 h with 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 or 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, a well described HIF-1 $\alpha$  stabilizing agent, prior to the addition of cycloheximide (CHX) to block ongoing protein synthesis (48). In the presence of CHX, the half-life of HIF-1 $\alpha$  was more than 45 min in CoCl<sub>2</sub>-treated cells and was extended to ~30 min in TGF $\beta$ 1-treated cells (Fig. 2D). Considering that in normoxic conditions HIF-1 $\alpha$  protein half-life is less than 5 min, these results indicate that HIF-1 $\alpha$  stabilization also contributes to the accumulation of HIF-1 $\alpha$  protein by TGF $\beta$ 1 (56).

We further investigated the impact of TGF $\beta$ 1 on the stability of HIF-1 $\alpha$  by transfecting HepG2 cells with a reporter plasmid expressing a protein that contains the HIF-1 $\alpha$  oxygen-dependent degradation domain (ODDD) fused with luciferase (CMV-Luc-

ODDD). It is well established that HIF-1 $\alpha$  degradation in normoxic conditions depends on post-translational modifications that consist in the hydroxylation of the prolines 402 and 564 located within the ODDD (11,12,57). Therefore, and as previously demonstrated, the levels of the fusion protein, monitored by measuring luciferase activity, are negatively regulated by the hydroxylation of Pro-402/564 which permits binding with the von Hippel Lindau and proteasomal degradation (48). Following the transfection with CMV-Luc-ODDD, HepG2 cells were stimulated for different time-periods with 0, 2 or 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 or with 200  $\mu$ M of CoCl<sub>2</sub>, used as a control. Results presented in Figure 2E indicate that TGF $\beta$ 1 increased luciferase-ODDD stabilization with maximal levels attained at 8 h of stimulation. Thus, these results indicate that TGF $\beta$ 1 treatment increases HIF-1 $\alpha$  protein stabilization through impaired prolyl hydroxylation.

***TGF $\beta$ 1 inhibits PHD2 expression levels.*** It has been established that prolyl hydroxylation by iron-dependant prolyl hydroxylases is a prerequisite for HIF-1 $\alpha$  degradation. Three mammalian prolyl hydroxylases (PHD1, PHD2 and PHD3) have been shown, *in vitro*, to hydroxylate key proline residues within the HIF-1 $\alpha$  molecule (13). To evaluate the impact of TGF $\beta$ 1 on the expression of mammalian prolyl hydroxylases, HepG2 and HT1080 cells were incubated with TGF $\beta$ 1 and the expression of PHD1, PHD2 and PHD3 was analyzed by immunoblotting. As presented in Figure 3A, TGF $\beta$ 1 dramatically decreased PHD2 protein levels in both cell lines with sustained effect from 4 to 16 h. The TGF $\beta$  effect is selective since no significant inhibition in PHD1 or PHD3 protein expression could be observed. Real-time PCR analysis of PHD2 mRNA levels in HepG2 cells indicated that TGF $\beta$ 1 treatments inhibited PHD2 mRNA expression to approximately 40

% of control cells at 4 and 8 h of stimulation with a milder effect observed at 16 h (Fig. 3B). These results clearly indicate that TGF $\beta$ 1 selectively decreases both PHD2 mRNA and protein expression. Since PHD2 has been identified as the critical oxygen sensor setting the low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia, our results suggest that the inhibition in PHD2 expression is one of the mechanism underlying TGF $\beta$ 1-induced HIF-1 $\alpha$  stabilization in normoxia.

***TGF $\beta$ 1 effects on HIF-1 $\alpha$  and PHD2 are mediated by several signaling pathways.***

TGF $\beta$ 1 mediates its cellular effects through several signaling pathways. Smad proteins are activated in all TGF $\beta$ -responsive cells, and generally play central roles in the manifestation of the biological activities of TGF $\beta$  (58). In addition to Smad activation, TGF $\beta$  can trigger other signaling pathways such as the MAPkinase Erk as well as the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) pathways which were previously demonstrated to play an important part in the induction of HIF-1 $\alpha$  protein expression in normoxia (45,59-61). To delineate which of the TGF $\beta$ 1-induced signaling pathways were implicated in the regulation of HIF-1 $\alpha$  protein accumulation, we pretreated HepG2 and HT1080 cells with compounds known to inhibit Erk (PD98059 and U0126), PI3K (Wortmannin and LY294002) and Smad (SB431542) pathways 15 min prior stimulation with TGF $\beta$ 1. We have previously reported that TGF $\beta$ 1 efficiently induced p42/44 MAPK and Smad2/3 activation in HepG2 cells using identical cell culture conditions (45). PI3K activation was also shown to be achieved in similar conditions in several tumor and hepatic cells lines (62,63). As depicted in Figure 4A, TGF $\beta$ 1-induced HIF-1 $\alpha$  accumulation was strongly inhibited by PD98059, U0126, LY294002 and SB431542. These results indicate that

TGF $\beta$ 1 mediates its action through activation of Erk, PI3K and Smads pathways. A similar pattern of response was observed when we examined HIF-1 $\alpha$  mRNA expression in HepG2 cells (Fig. 4B), indicating a correlation between signaling pathways involved in HIF-1 $\alpha$  gene transcription and protein accumulation.

In addition to the regulation of HIF-1 $\alpha$  by TGF $\beta$ 1, our results indicate that PHD2 protein and mRNA expression are specifically targeted by this growth factor. In an attempt to get insight into the signaling pathways that mediate the inhibition of PHD2 expression by TGF $\beta$ 1, HepG2 cells were pretreated with the kinase inhibitors PD98059, U0126, Wortmannin, LY294002 or SB431542 15 min prior stimulation with TGF $\beta$ 1. Results illustrated in Figure 4C indicate that inhibition of Erk and PI3K pathways impaired TGF $\beta$ 1-induced decrease of PHD2 protein expression in HepG2 cell. In contrast, inhibition of the Smad pathway by SB-431542 used at concentrations (10  $\mu$ M) that block more than 95% of the Smad signaling pathway (ref (64,65) and, data not shown) did not affect the reduction in PHD2 levels induced by TGF $\beta$ 1.

***Endogenous TGF $\beta$ 1 regulates HIF-1 $\alpha$  expression.*** TGF $\beta$ 1 is produced as an inactive precursor (pro-TGF $\beta$ 1) that requires limited proteolytic cleavage to produce the mature and bioactive growth factor (66). Previous data obtained in our laboratory indicate that furin, the best characterized member of the mammalian proprotein convertases (PC) family, is the most important enzyme responsible for pro-TGF $\beta$ 1 proteolytic processing (67). In order to determine the impact of the production of endogenous TGF $\beta$ 1 on HIF-1 $\alpha$  expression, we used a cell model previously established in our laboratory consisting of HT1080 cells stably transfected with  $\alpha$ 1-PDX, a serpin modified to acquire potent furin

inhibition capacity (clones PDX-A, PDX-B and PDX-C), or with an empty pCDNA3 vector (control clone)(68). Expression of  $\alpha 1$ -PDX resulted in the inhibition of the release of bioactive TGF $\beta$ 1 in cellular supernatants (67,69). As illustrated in Figure 5A, basal nuclear accumulation of HIF-1 $\alpha$  observed in HT1080 control (CTL) clone was inhibited in cells expressing  $\alpha 1$ -PDX (PDX-A). We also used dec-RVKR-cmk, a synthetic furin inhibitory peptide that mimics the proprotein recognition site (70). Similarly, treatment of CTL clone with dec-RVKR-cmk resulted in dose-dependent decrease in nuclear HIF-1 $\alpha$  protein levels. Since furin has the capability to process/activate other growth factors such as PDGF which has been shown to also induce HIF-1 $\alpha$  normoxic accumulation in a particular cell system (vascular smooth muscle cells), we performed a growth factor reconstitution experiment to verify whether the impact of furin inhibition on HIF-1 $\alpha$  basal expression in HT1080 cells was mediated by TGF $\beta$ 1 (17,18,42). Stimulation of the PDX-A clone with TGF $\beta$ 1 reconstituted HIF-1 $\alpha$  expression to basal levels, indicating that impaired bioactivation of TGF $\beta$ 1 was responsible for the decrease in HIF-1 $\alpha$  expression observed following expression of the furin inhibitor  $\alpha 1$ -PDX. Moreover, stimulation of HepG2 cells with PDGF-AA and PDGF-BB failed to induce HIF-1 $\alpha$  expression (data not shown). Northern blot analysis revealed that  $\alpha 1$ -PDX expression or dec-RVKR-cmk treatment decreased HIF-1 $\alpha$  mRNA levels (Fig. 5B). This is consistent with results indicating that TGF $\beta$ 1 regulates HIF-1 $\alpha$  at the mRNA level (see Fig.2). Thus, endogenous production of bioactive TGF $\beta$ 1 efficiently regulates HIF-1 $\alpha$  expression in HT1080 cells.

***TGFβ1-induced expression of VEGF is partly mediated by HIF-1.*** Several studies have demonstrated that TGFβ1 enhances VEGF production, a key target of HIF-1α, in a wide variety of tumors *in vivo* and cells lines *in vitro* (44,71-74). We therefore examined whether the impaired production of bioactive TGFβ1 in α1-PDX overexpressing HT1080 cells could impact VEGF production. As presented in Figure 5C, decreased levels of VEGF in cells supernatants were measured in cells expressing α1-PDX. The reduction of basal VEGF production was proportional to the expression of the furin inhibitor by the different PDX clones. Stimulation of the highest α1-PDX expressing clone (PDX-A) with TGFβ1 reconstituted VEGF production to levels similar to those produced by parental and CTL (empty vector) HT1080 cultures (Fig. 5D). Therefore, endogenous expression of TGFβ1 regulates both HIF-1 and VEGF expression in HT1080 cells.

The possible involvement of HIF-1 in VEGF expression induced by TGFβ1 was studied using two different HIF-1-inhibited cell systems. The first one consisted of HT1080 cells stably transfected with a dominant-negative form of HIF-1α (HIF-1αDN). Northern blot analysis confirmed the expression of HIF-1αDN (Fig. 6A insert). As presented in Figure 6A, a marked inhibition of VEGF was detected in HT1080 cells expressing HIF-1αDN. Stimulation of the HIF-1αDN cells with TGFβ1 partly reconstituted VEGF expression up to control levels, indicating that HIF-1 signaling is one of the mechanisms by which TGFβ1 induces VEGF. In the second system, we studied TGFβ1-induced VEGF expression in WT or HIF-1α-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEF). When stimulated with TGFβ1, a 16.6 fold-increase in VEGF production was observed in WT MEF cells compared to a 7.1 fold-increase in HIF-1α<sup>-/-</sup> cells (fig. 6B). Immunoblot



analysis demonstrated an efficient increase of HIF-1 $\alpha$  in HIF-1 $\alpha$ -proficient MEF cells treated with TGF $\beta$ 1 (Fig. 6C). Moreover, treatment of WT MEF cells with YC-1, a chemical inhibitor known to inhibit HIF-1 $\alpha$  expression, resulted in impaired VEGF production in response to TGF $\beta$ 1 (data not shown) (75). Therefore, these results clearly indicate that the HIF-1 complex induced by TGF $\beta$ 1 contributes to the mechanism by which TGF $\beta$ 1 stimulates VEGF production.

## **DISCUSSION:**

Hypoxia is known to strongly increase HIF-1 $\alpha$  protein expression levels by blocking its ubiquitin/proteasome-dependent degradation through the inhibition of prolyl hydroxylase activity, without concomitant elevation of HIF-1 $\alpha$  transcription or translation. Several stimuli were shown to induce HIF-1 $\alpha$  accumulation in normoxic conditions by mechanisms that generally diverge from those used in hypoxia. Only few stimuli such as the NO donor s-nitrosoglutathione (GSNO) and muscarinic receptor activation are known to impact HIF-1 $\alpha$  protein stability by inhibiting prolyl hydroxylases activity through a yet unknown mechanism (76,77). In contrast, growth factors, hormones and cytokines were shown to preferably upmodulate HIF-1 $\alpha$  protein expression levels by increasing gene transcription and/or mRNA translation without affecting protein stability. The tumor necrosis factor- $\alpha$  and insulin induce HIF-1 $\alpha$  protein accumulation by increasing HIF-1 $\alpha$  translation through nuclear factor-kappa B or PI3K-dependent pathways, respectively (23,78). On the other hand, the hepatocyte growth factor enhances HIF-1 $\alpha$  protein levels by increasing both HIF-1 $\alpha$  transcription and translation (24). Recently, the growth factor TGF $\beta$ 1 emerged as an agonist that induces HIF-1 $\alpha$  accumulation under normoxic conditions in different cell lines such as HT1080 and vascular smooth muscle cells, but the mechanism underlying this regulation remained unexplored. In this study, we

investigated the molecular mechanisms used by the pro-inflammatory and tumor growth factor, TGF $\beta$ 1 to increase HIF-1 $\alpha$  protein expression in normoxia. Here, we demonstrate that TGF $\beta$ 1 utilizes at least two distinct mechanisms to enhance HIF-1 $\alpha$  protein accumulation in HT1080 and HepG2 cells. The first implicate enhanced HIF-1 $\alpha$  gene transcription, while the second involves increased HIF-1 $\alpha$  protein stabilization through a novel mechanism involving decreased PHD2 expression.

We report here that TGF $\beta$ 1 increases HIF-1 $\alpha$  mRNA levels in HepG2 and HT1080 cells through transcriptional regulation. Enhancement in HIF-1 $\alpha$  gene transcription was also observed in vascular smooth muscle cells stimulated with angiotensin II or thrombin, in macrophages treated with LPS, and in HepG2 and MCF-7 cell lines stimulated with hepatocyte growth factor (HGF)(18,22,24,53). To our knowledge, this is the case for only a restricted number of stimuli since the common HIF-1 $\alpha$  inducers hypoxia, NO and TNF- $\alpha$  do not appear to modulate HIF-1 $\alpha$  mRNA levels (21,77,79,80). A second mechanism involved in TGF $\beta$ 1-induced HIF-1 $\alpha$  accumulation is through enhanced HIF-1 $\alpha$  protein stability. TGF $\beta$ 1 specifically targets PHD2 mRNA and protein expression. Decreased PHD2 expression in response to TGF $\beta$ 1 is associated with inhibition of HIF-1 $\alpha$  ODDD prolyl hydroxylation, which resulted in increased protein stability. Within the mammalian prolyl hydroxylase family, PHD2 is now regarded as the main cellular oxygen sensor that regulates HIF-1 $\alpha$  degradation in normoxia. An elegant set of experiments using PHD2 siRNA demonstrated that slight reduction of the PHD2 protein is sufficient to impact on HIF-1 $\alpha$  stability in normoxia in a battery of human cell lines, while PHD1 and PHD3 silencing failed to increase HIF-1 $\alpha$  expression levels (14). Consistent with this, the strong

and persistent reduction in PHD2 levels observed in the presence of TGF $\beta$ 1, together with the decrease in HIF-1 $\alpha$  ODDD prolyl hydroxylation strongly suggest that inhibition of PHD2 expression levels is the underlying mechanism involved in TGF $\beta$ 1-induced HIF-1 $\alpha$  protein stability. Up to now, very little information is available on the cellular aspects controlling PHDs expression. A few non-hypoxic stimuli (NO donors and ROS inducing agents) were previously shown to modulate HIF-1 $\alpha$  stability through the inhibition of PDH activity but without any alteration in PHD expression (77,81). To our knowledge, hypoxia is the only other stimulus known to affect PHD2 expression levels, but in contrast to TGF $\beta$ 1, an increase in the transcription of PHD2 gene was observed through HIF-1 transcriptional activity (82). Thus, our work presents the first evidence that links extracellular cell stimulation to changes in HIF-1 $\alpha$  hydroxylation and degradation, mediated by decreased levels of PDHs. Since TGF $\beta$ 1 was previously demonstrated to induce the production of reactive oxygen species (ROS) in multiple cells, a regulatory effect of TGF $\beta$ 1 on prolyl hydroxylases activity cannot be excluded (83,84). However, we do not believe that this would represent a major pathway for TGF $\beta$ 1 action since stimuli that down regulate prolyl hydroxylases activity increase HIF-1 $\alpha$  expression more rapidly (less than 30 min) as compared to TGF $\beta$ 1 ( $\approx$  2-4 h) (77).

The dual effect on mRNA synthesis and protein stability seems to account in a sequential/additive manner for the accumulation of HIF-1 $\alpha$  protein in response to TGF $\beta$ 1. While the increase in HIF-1 $\alpha$  protein levels was observed at 4 h stimulation in HepG2 cells, changes in HIF-1 $\alpha$  mRNA levels were detected later on at 8 h following TGF $\beta$ 1 addition. However, in the same cell type, inhibition of both PHD2 expression and HIF-1 $\alpha$

ODDD hydroxylation/degradation were readily observed following 4 h of stimulation with TGF $\beta$ 1. Thus, events leading to increased HIF-1 $\alpha$  protein stability are likely to be involved in the early accumulation of HIF-1 $\alpha$  and act, subsequently, in an additive manner with increased HIF-1 $\alpha$  transcription to yield the maximal HIF-1 $\alpha$  proteins levels reached at 8 and 16 h of TGF $\beta$ 1 stimulation. The strong and persistent inhibition in PHD2 expression, together with the lack of clear additive effect between TGF $\beta$ 1 and other agents acting at the level of HIF-1 $\alpha$  stabilization (data not shown) suggest that transcription of new HIF-1 $\alpha$  mRNA plays a minor role in the overall HIF-1 $\alpha$  accumulation by TGF $\beta$ 1.

Both mechanisms that contribute to HIF-1 $\alpha$  accumulation in response to TGF $\beta$ 1 take place through shared and divergent signaling pathways. Our results demonstrate that Erk, PI3K and Smads pathways are likely involved in TGF $\beta$ 1-induced HIF-1 $\alpha$  protein expression. As opposed to Erk and PI3K, Smad signaling did not appear to be implicated in the down-modulation of PHD2 expression in response to TGF $\beta$ 1, suggesting that this TGF $\beta$ -specific signaling pathway would rather more impact HIF-1 $\alpha$  gene transcription. The Erk and PI3K pathways can work in different ways to inhibit gene expression. In fact, it was recently shown that P42/44 MAPK can control the recruitment of histone deacetylases (HDAC) to promoter activation sites resulting in inhibited gene expression (85). The Erk pathway was also proposed to activate repressors that directly bind to DNA, such as the human Kruppel-related factor YY1 and the human bZIP protein E4BP4, for which several putative binding sites were observed within the PHD2 promoter sequence (86). Moreover, induction of PI3K enhances the metabolic stability of endogenous p300

protein, a coactivator required by many transcription factors to either activate or repress gene expression (87). In addition to Smads, the use of kinase inhibitors indicated that Erk and PI3K pathways also play an important part in TGF $\beta$ 1-induced HIF-1 $\alpha$  transcription, possibly by stimulating the HIF-1 $\alpha$  gene promoter. Interestingly, analysis of HIF-1 $\alpha$  promoter sequence revealed the presence of putative sites that can be transactivated by factors triggered by these signaling pathways such as SP1, CREB and Smads. Cross-talk between Erk, PI3K and Smad signaling pathways, leading to amplified intracellular signals, has been reported and may possibly account for the strong impairment of TGF $\beta$ 1-induced HIF-1 $\alpha$  mRNA levels observed when inhibiting either of these pathways (see Figure 4B) (45,88,89).

Several studies have reported normoxic HIF-1 $\alpha$  expression in several tumors in vivo and cell lines in vitro (90-92). Interestingly, numerous tumor cells express high level of both TGF $\beta$ 1 and its convertase furin, an enzyme recently identified in our laboratory as a HIF-1 $\alpha$ -regulated target (38,93-96). In this context, we set out to investigate whether the endogenous production of bioactive TGF $\beta$ 1 by tumors cells could be involved in regulating HIF-1 $\alpha$  normoxic expression. As expected, impairment in the release of bioactive TGF $\beta$ 1 through inhibition of furin resulted in a marked decrease in HIF-1 $\alpha$  expression levels. This effect was recovered following the addition of TGF $\beta$ 1, consistent with the idea that endogenous levels of TGF $\beta$ 1 efficiently regulates basal HIF-1 $\alpha$  expression. Such process may permit upmodulation of furin expression and create an activation/regulation cycle favoring the production of bioactive TGF $\beta$ 1 and the accumulation of HIF-1 $\alpha$ .

TGF $\beta$ 1 was previously shown to induce VEGF production in several cell lines through transcriptional activation with no significant changes in mRNA turnover. The possible involvement of AP-1 and HIF-1 in this regulation has been proposed, however, the exact contribution of HIF-1 in TGF $\beta$ 1-induced VEGF production remained unexplored (44). Using two different HIF-1-inhibited cell systems, we demonstrated that TGF $\beta$ 1-induced HIF-1 also plays a significant role (40% to 50%) in VEGF production in response to TGF $\beta$ 1. This result provides an additional mechanistic link between TGF $\beta$ 1 and VEGF expression and suggests that the same transcription factor HIF-1 lies at the heart of VEGF production triggered by both the hypoxic and the inflammatory zones of the tumor and/or inflamed tissue.

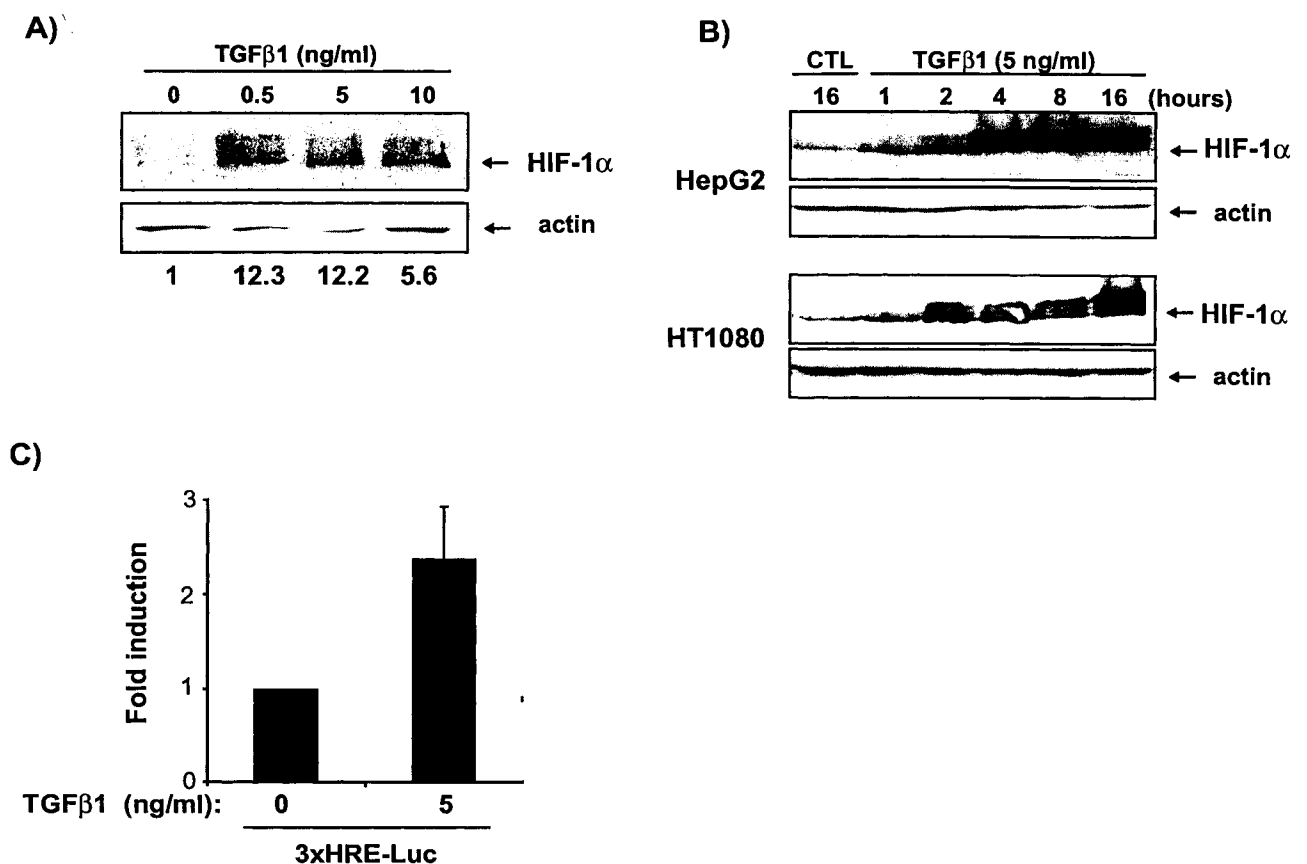
Finally, our data suggest that HIF-1 may act as a protumorigenic and proinflammatory factor under normoxia in part through TGF $\beta$ -mediated inhibition of PHD2 levels, a mechanism distinct from the ones known to be used by other growth factors and proinflammatory molecules. Because a combination of cytokines and growth factors such as TNF $\alpha$  and IL-1 are frequently detected in the tumor and/or inflammatory milieu, one can hypothesize that multiple HIF-1 regulation checkpoints should coexist in order to raise HIF-1 to levels needed to meet the increase in biologic and metabolic demand of the tissue. This will result in an increased expression of specific genes such as VEGF (Figure 7). The fact that among these cytokines and growth factors, TGF $\beta$  is abundantly and widely expressed by both inflammatory cells and tumor cells, combined with recent advances indicating that this growth factor is key in the promotion of both tumor growth

and inflammation, suggest that agents that counteract or overcome prolyl hydroxylase inhibition may provide a therapeutic advantage to the host (97).

#### **ACKNOWLEDGMENTS:**

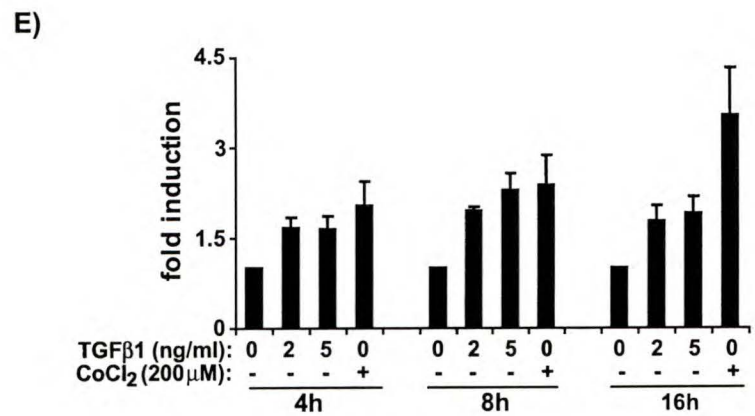
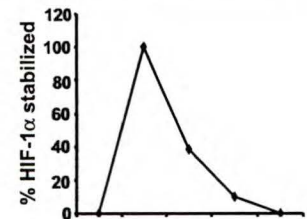
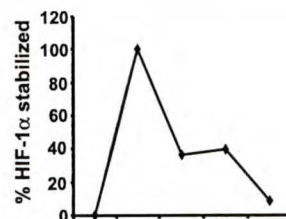
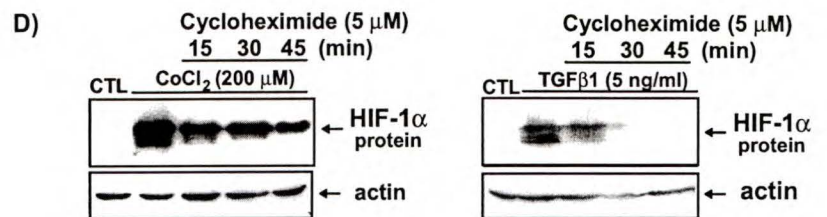
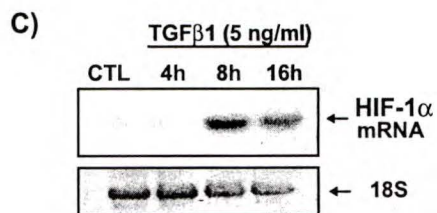
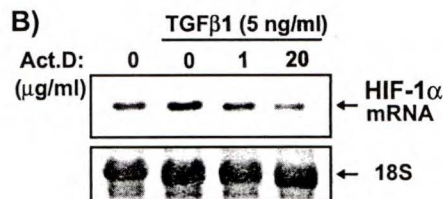
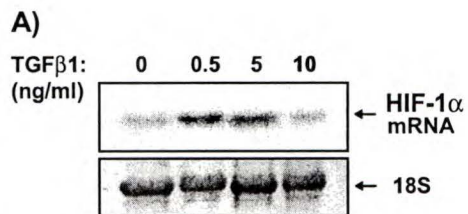
The authors would like to thank Francine Grondin for her excellent technical assistance. S. McMahon is a recipient of a studentship of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (MOP-67021 and MOP-68944 to C.M. Dubois).



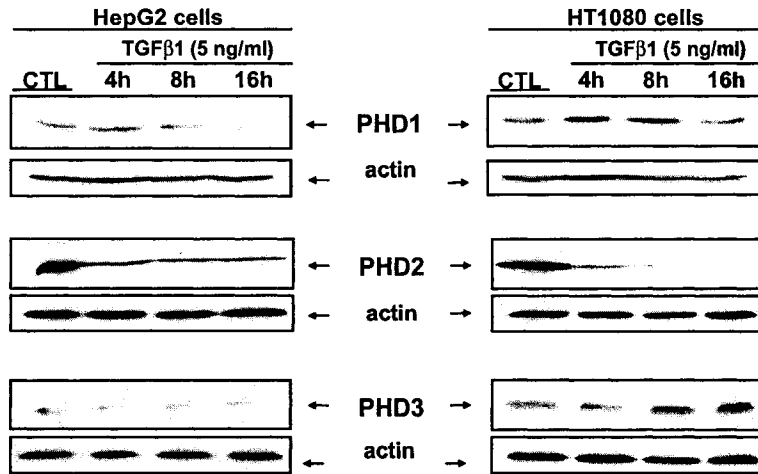


**Figure 1: Induction of HIF-1α protein in response to TGFβ1.** HepG2 and/or HT1080 cells were serum starved and stimulated or not A) with TGFβ1 at concentrations ranging between 0 to 10 ng/ml for 6 h or B) with 5 ng/ml TGFβ1 for time-periods ranging from 1 to 16 h. Nuclear extracts (100μg/lane) were resolved on 7.5% SDS-PAGE gels and immunoblotted using a rabbit antiserum specific to human HIF-1α or an anti-actin antibody as an internal control. C) HepG2 cells were transiently transfected with 2 ug/well of PRE-tk-LUC promoter construct. Cells were incubated overnight in serum-free media in the presence or absence of 5 ng/ml TGFβ1 before luciferase activity measurement. Data are expressed as the mean ± SEM, n=3, \*p< 0.05, compared to non-stimulated cells.

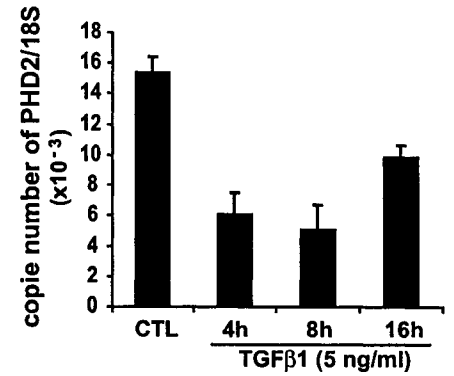
**Figure 2: TGF $\beta$ 1 increases HIF-1 $\alpha$  mRNA expression.** HepG2 cells were serum starved and stimulated with A) 0 to 10 ng/ml TGF $\beta$ 1 for 6 h, B) 0 to 20  $\mu$ g/ml Actinomycin D added 30 minutes prior stimulation with 0 or 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 for 6 h or C) 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 for time-periods ranging from 4 to 16 h. Total RNA (5  $\mu$ g/lane) was probed using a specific HIF-1 $\alpha$  human [ $^{32}$ P]-labelled riboprobe. 18S was used as an internal control. D) HepG2 cells were serum starved and cultured in the presence or absence of 200  $\mu$ M of CoCl $_2$  or 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 for 6 h. Following stimulations, 5  $\mu$ M of cycloheximide was added to cell cultures for time-periods ranging from 15 to 45 min. Nuclear extracts were analyzed by Western blotting using a rabbit antiserum specific to human HIF-1 $\alpha$  or an anti-actin antibody as an internal control. The densitometry ratio of HIF-1 $\alpha$  nuclear accumulation/actin is represented were 100% equal to HIF-1 $\alpha$  levels in non-stimulated cells. E) HepG2 cells were transiently transfected with 2  $\mu$ g/well of CMV-Luc-HIF-1 $\alpha$  ODDD construct. Cells were serum starved and incubated for time-periods ranging from 4h to 16 h with 0 to 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 or 200  $\mu$ M CoCl $_2$  before luciferase activity measurement. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM, n=2 to 5.



A)



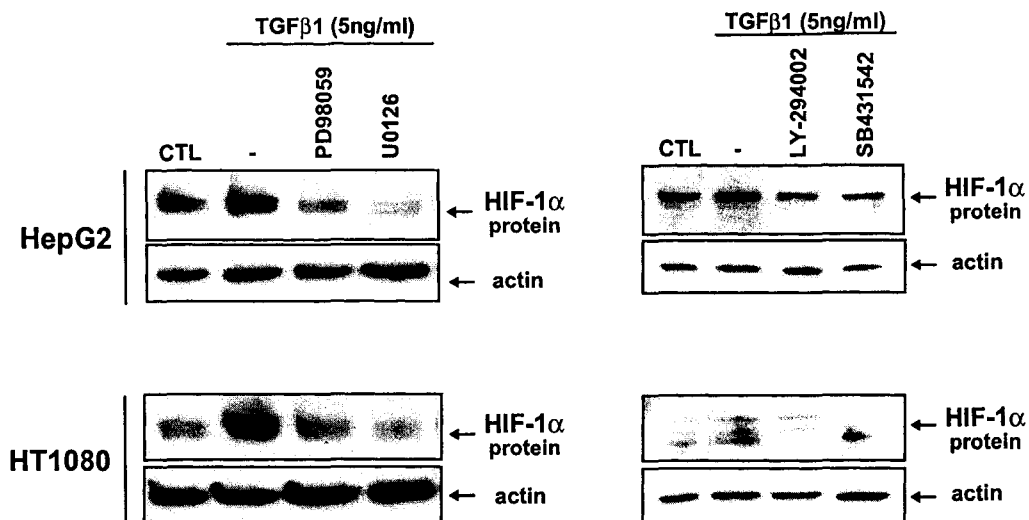
B)



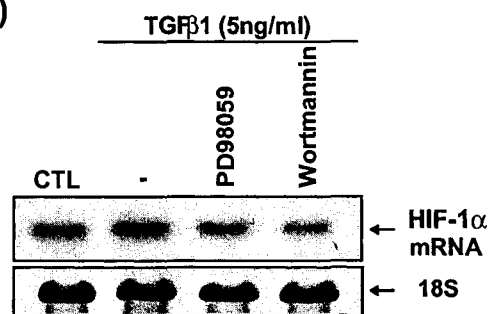
**Figure 3: TGFβ1 decreases PHD2 expression.** HepG2 and HT1080 cells were serum starved and stimulated or not with 5 ng/ml TGFβ1 for time-periods ranging from 4 to 16 h. A) Total cell lysates (75 μg/lane) were resolved on 7.5% SDS-PAGE gels and immunoblotted using antibodies specific for PHD1, PHD2 or PHD3 and an anti-actin antibody as an internal control. B) Total RNA was extracted from HepG2 cells and reverse-transcribed using random decamer primers. Quantification of PHD2 mRNA levels was performed by Real-time PCR. Results are expressed as the fold induction ± SEM (n=2) relative to 18S.

**Figure 4: TGFβ1 effects are mediated by MAPK p42/44, PI3K and Smads.** HepG2 and/or HT1080 cells were serum starved and treated or not with PD98059 (5 μM), SB202190 (5 μM), U0126 (5 μM), LY294002 (20 μM), SB431542 (10 μM) or Wortmannin (1 μM) 15 min prior stimulation with 5 ng/ml TGFβ1 for 6 h . A) Nuclear cell extracts (100μg/lane) were resolved on 7.5% SDS-PAGE gels and immunoblotted using a rabbit antiserum specific to human HIF-1α or an anti-actin antibody as an internal control. B) Total RNA (5 μg/lane) was probe with a specific HIF-1α human [<sup>32</sup>P]-labelled riboprobe. 18S was used as an internal control. C) Total cell lysates (75 μg/lane) were resolved on 7.5% SDS-PAGE gels and immunoblotted using an antibody specific to human PHD2 or an anti-actin antibody as an internal control.

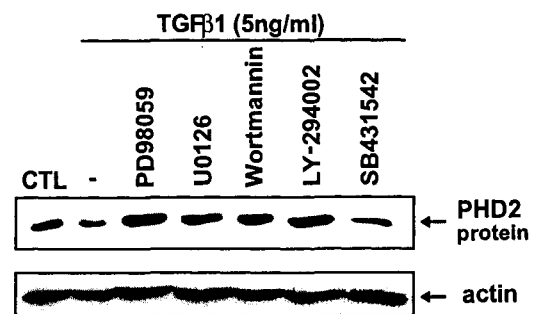
A)



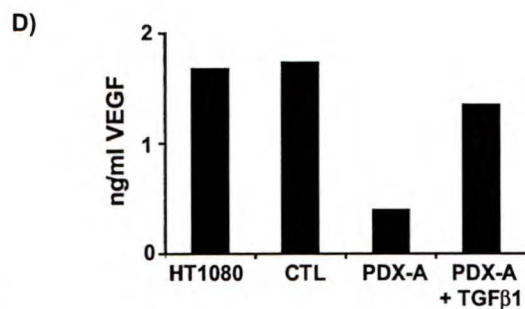
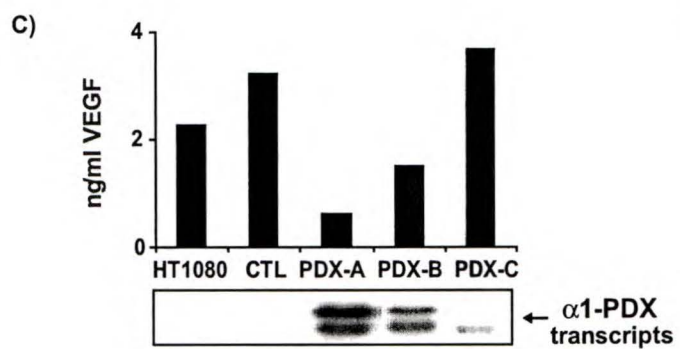
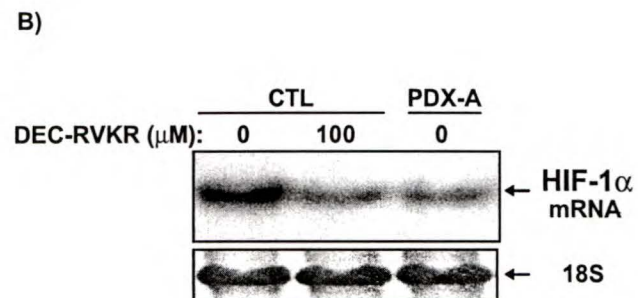
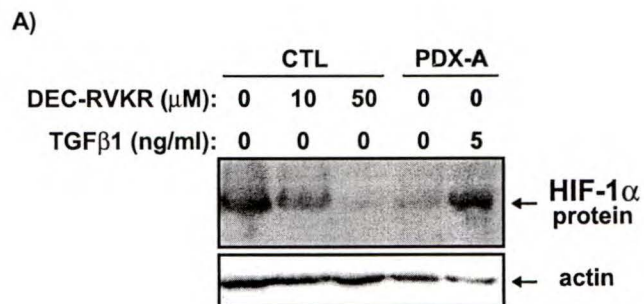
B)



C)



**Figure 5: Inhibition of TGFβ1 maturation decreases basal HIF-1α protein and mRNA expression.** HT1080 cells were stably transfected with the furin inhibitor α1-PDX (clones PDX-A, PDX-B and PDX-C) or the empty vector (control clone CTL). A) Cells were treated with 0 to 100 uM of the convertase inhibitor Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketone (DEC-RVKR) or with 5 ng/ml of TGFβ1 for 6h. Nuclear extracts (100μg/lane) were analyzed by Western blotting using a rabbit antiserum specific to human HIF-1α or an anti-actin antibody as an internal control. B) Cells were treated or not with 100 uM of DEC-RVKR for 6 h. Total mRNA (5μg/lane) was analyzed by Northern blotting using a human HIF-1α [<sup>32</sup>P]-labelled riboprobe. 18S was used as an internal control. C) For quantitative determination of VEGF, cells were seeded at 6x10<sup>5</sup> cells/well of 24 well plates, serum starved and cultured overnight in serum-free media. Measurement of VEGF within cell conditioned media was performed using an ELISA assay specific to human VEGF. The expression of α1-PDX was analyzed by Northern blotting using a human α1 anti-trypsin [<sup>32</sup>P]-labelled riboprobe. D) HT1080 WT, control and PDX-A cells were treated with 0 or 5 ng/ml TGFβ1 for 16 h prior VEGF measurement. Results obtained from VEGF measurement are expressed as a representative experiment out of three different ones.

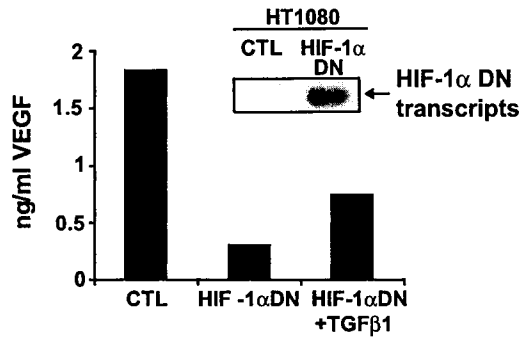




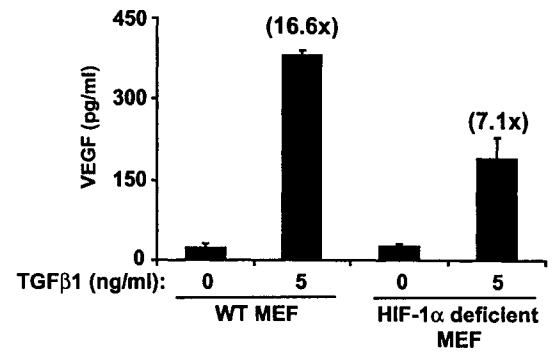
**Figure 6: Cells deficient for HIF-1 $\alpha$  produce decreased VEGF levels in response to TGF $\beta$ 1.**

A) HT1080 cells were stably transfected with the dominant negative form of HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ DN clone) or the empty vector (control clone CTL). The expression of HIF-1 $\alpha$ DN was analyzed by Northern blotting using a human HIF-1 $\alpha$ DN [ $^{32}$ P]-labelled riboprobe. HT1080 control and HIF-1 $\alpha$ DN-expressing cells conditioned media were obtained following overnight stimulation with 0 or 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 and assayed for VEGF quantification. B) Wild type (WT) and HIF-1 $\alpha$  knock-out mouse embryonic fibroblasts (MEF) were seeded at  $6 \times 10^5$  cells/well of 24 well plates. Cells were cultured overnight in serum-free media in the presence or the absence of 5 ng/ml TGF $\beta$ 1. Quantitative determination of VEGF in cell supernatants was assessed by using an ELISA assay specific to murin VEGF. C) WT and HIF-1 $\alpha$  knock-out MEF cells were serum starved and stimulated with 0 or 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 for 6 h. Nuclear extracts (75  $\mu$ g/lane) were resolved on 7.5% SDS-PAGE gels and immunoblotted using a rabbit antiserum specific to human HIF-1 $\alpha$  or an anti-actin antibody as an internal control.

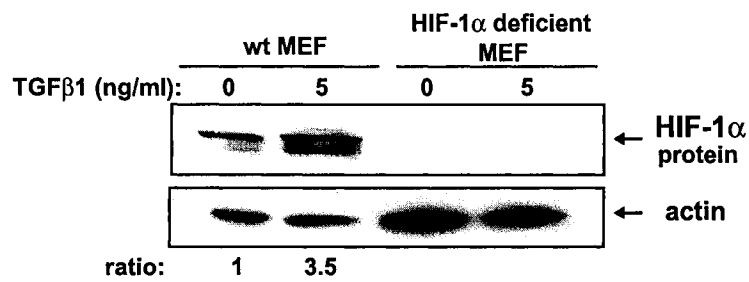
A)

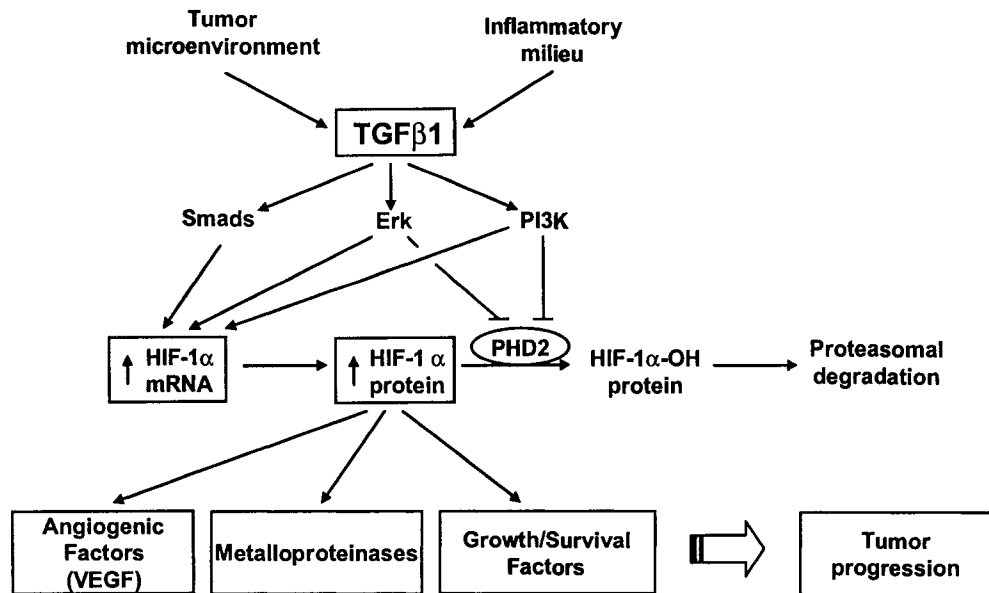


B)



C)





**Figure7: Schematic diagram of the mechanisms by which TGFβ1 regulates HIF-1α.** Tumor and inflammatory milieu express large amounts of TGFβ1. TGFβ1 will use selected signal transduction pathways to increase HIF-1α accumulation by increasing HIF-1α gene transcription and by enhancing the protein half-life through inhibition of PHD2 expression levels. The HIF-1 complex will then impact on inflammation and/or tumor progression by enhancing genes implicated in angiogenesis, cell invasion and chemotaxis as well as cell growth and survival.

## REFERENCES:

1. Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Harris, A. L. (2000) *Am J Pathol* **157**, 411-421
2. Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W. B., Semenza, G. L., and Simons, J. W. (1999) *Cancer Res* **59**, 5830-5835
3. Kuwai, T., Kitadai, Y., Tanaka, S., Onogawa, S., Matsutani, N., Kaio, E., Ito, M., and Chayama, K. (2003) *Int J Cancer* **105**, 176-181
4. Maxwell, P. H., Dachs, G. U., Gleadle, J. M., Nicholls, L. G., Harris, A. L., Stratford, I. J., Hankinson, O., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8104-8109
5. Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., Madan, A., Semenza, G. L., and Bedi, A. (2000) *Genes Dev* **14**, 34-44
6. Kung, A. L., Wang, S., Klco, J. M., Kaelin, W. G., and Livingston, D. M. (2000) *Nat Med* **6**, 1335-1340
7. Stoeltzing, O., McCarty, M. F., Wey, J. S., Fan, F., Liu, W., Belcheva, A., Bucana, C. D., Semenza, G. L., and Ellis, L. M. (2004) *J Natl Cancer Inst* **96**, 946-956
8. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5510-5514
9. Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Klausner, R. D., and Pause, A. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12436-12441

10. Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., and Ratcliffe, P. J. (1999) *Nature* **399**, 271-275
11. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) *Science* **292**, 468-472
12. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G., Jr. (2001) *Science* **292**, 464-468
13. Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J., and Ratcliffe, P. J. (2001) *Cell* **107**, 43-54
14. Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., and Pouyssegur, J. (2003) *Embo J* **22**, 4082-4090
15. Vukovic, V., Haugland, H. K., Nicklee, T., Morrison, A. J., and Hedley, D. W. (2001) *Cancer Res* **61**, 7394-7398
16. Janssen, H. L., Haustermans, K. M., Sprong, D., Blommestijn, G., Hofland, I., Hoebbers, F. J., Blijweert, E., Raleigh, J. A., Semenza, G. L., Varia, M. A., Balm, A. J., van Velthuysen, M. L., Delaere, P., Sciort, R., and Begg, A. C. (2002) *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54**, 1537-1549
17. Richard, D. E., Berra, E., and Pouyssegur, J. (2000) *J Biol Chem* **275**, 26765-26771
18. Gorlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V. B., Berchner-Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R. P., Kietzmann, T., and Busse, R. (2001) *Circ Res* **89**, 47-54

19. Jung, Y. J., Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J., and Neckers, L. (2003) *Faseb J* **17**, 2115-2117
20. Haddad, J. J., and Land, S. C. (2001) *FEBS Lett* **505**, 269-274
21. Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., and Jelkmann, W. (1999) *Blood* **94**, 1561-1567
22. Page, E. L., Robitaille, G. A., Pouyssegur, J., and Richard, D. E. (2002) *J Biol Chem* **277**, 48403-48409
23. Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Semenza, G. L., and Van Obberghen, E. (2002) *J Biol Chem* **277**, 27975-27981
24. Tacchini, L., De Ponti, C., Matteucci, E., Follis, R., and Desiderio, M. A. (2004) *Carcinogenesis* **25**, 2089-2100
25. Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y. D., Ellis, L. M., and Semenza, G. L. (2002) *J Biol Chem* **277**, 38205-38211
26. Pasche, B. (2001) *J Cell Physiol* **186**, 153-168
27. Mantovani, A., Allavena, P., and Sica, A. (2004) *Eur J Cancer* **40**, 1660-1667
28. Breier, G., Blum, S., Peli, J., Groot, M., Wild, C., Risau, W., and Reichmann, E. (2002) *Int J Cancer* **97**, 142-148
29. Santibanez, J. F., Guerrero, J., Quintanilla, M., Fabra, A., and Martinez, J. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 267-273
30. Weeks, B. H., He, W., Olson, K. L., and Wang, X. J. (2001) *Cancer Res* **61**, 7435-7443
31. Lin, S. W., Lee, M. T., Ke, F. C., Lee, P. P., Huang, C. J., Ip, M. M., Chen, L., and Hwang, J. J. (2000) *Clin Exp Metastasis* **18**, 493-499

32. Lu, S. L., Reh, D., Li, A. G., Woods, J., Corless, C. L., Kulesz-Martin, M., and Wang, X. J. (2004) *Cancer Res* **64**, 4405-4410
33. McMahon, S., Laprise, M. H., and Dubois, C. M. (2003) *Exp Cell Res* **291**, 326-339
34. Benckert, C., Jonas, S., Cramer, T., Von Marschall, Z., Schafer, G., Peters, M., Wagner, K., Radke, C., Wiedenmann, B., Neuhaus, P., Hocker, M., and Rosewicz, S. (2003) *Cancer Res* **63**, 1083-1092
35. Teraoka, H., Sawada, T., Nishihara, T., Yashiro, M., Ohira, M., Ishikawa, T., Nishino, H., and Hirakawa, K. (2001) *Br J Cancer* **85**, 612-617
36. Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., and Semenza, G. L. (1996) *Mol Cell Biol* **16**, 4604-4613
37. Blanchette, F., Day, R., Dong, W., Laprise, M. H., and Dubois, C. M. (1997) *J Clin Invest* **99**, 1974-1983
38. McMahon, S., Grondin, F., McDonald, P. P., Darren, R. E., and Dubois, C. M. (2004) *J Biol Chem*
39. Yana, I., and Weiss, S. J. (2000) *Mol Biol Cell* **11**, 2387-2401
40. Duguay, S. J., Milewski, W. M., Young, B. D., Nakayama, K., and Steiner, D. F. (1997) *J Biol Chem* **272**, 6663-6670
41. Siegfried, G., Basak, A., Cromlish, J. A., Benjannet, S., Marcinkiewicz, J., Chretien, M., Seidah, N. G., and Khatib, A. M. (2003) *J Clin Invest* **111**, 1723-1732
42. Siegfried, G., Khatib, A. M., Benjannet, S., Chretien, M., and Seidah, N. G. (2003) *Cancer Res* **63**, 1458-1463

43. Manalo, D. J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B. D., Ye, S. Q., Garcia, J. G., and Semenza, G. L. (2005) *Blood* **105**, 659-669
44. Shih, S. C., and Claffey, K. P. (2001) *Growth Factors* **19**, 19-34
45. Blanchette, F., Rivard, N., Rudd, P., Grondin, F., Attisano, L., and Dubois, C. M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 33986-33994
46. Chomczynski, P. (1993) *Biotechniques* **15**, 532-534, 536-537
47. Langlois, M. F., Zanger, K., Monden, T., Safer, J. D., Hollenberg, A. N., and Wondisford, F. E. (1997) *J Biol Chem* **272**, 24927-24933
48. Salnikow, K., Donald, S. P., Bruick, R. K., Zhitkovich, A., Phang, J. M., and Kasprzak, K. S. (2004) *J Biol Chem* **279**, 40337-40344
49. Tian, H., McKnight, S. L., and Russell, D. W. (1997) *Genes Dev* **11**, 72-82
50. Maehara, Y., Kakeji, Y., Kabashima, A., Emi, Y., Watanabe, A., Akazawa, K., Baba, H., Kohnoe, S., and Sugimachi, K. (1999) *J Clin Oncol* **17**, 607-614
51. Fukuchi, M., Miyazaki, T., Fukai, Y., Nakajima, M., Sohda, M., Masuda, N., Manda, R., Tsukada, K., Kato, H., and Kuwano, H. (2004) *Clin Cancer Res* **10**, 2738-2741
52. Semenza, G. L., and Wang, G. L. (1992) *Mol Cell Biol* **12**, 5447-5454
53. Blouin, C. C., Page, E. L., Soucy, G. M., and Richard, D. E. (2004) *Blood* **103**, 1124-1130
54. Salceda, S., and Caro, J. (1997) *J Biol Chem* **272**, 22642-22647
55. Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H. F. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7987-7992
56. Jewell, U. R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R. H., and Gassmann, M. (2001) *Faseb J* **15**, 1312-1314



57. Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) *Embo J* **20**, 5197-5206
58. Massague, J. (1998) *Annu Rev Biochem* **67**, 753-791
59. Qian, D., Lin, H. Y., Wang, H. M., Zhang, X., Liu, D. L., Li, Q. L., and Zhu, C. (2004) *Biol Reprod* **70**, 1822-1827
60. Zhou, J., Callapina, M., Goodall, G. J., and Brune, B. (2004) *Cancer Res* **64**, 9041-9048
61. Semenza, G. (2002) *Biochem Pharmacol* **64**, 993-998
62. Valdes, F., Murillo, M. M., Valverde, A. M., Herrera, B., Sanchez, A., Benito, M., Fernandez, M., and Fabregat, I. (2004) *Exp Cell Res* **292**, 209-218
63. Shigeoka, Y., Igishi, T., Matsumoto, S., Nakanishi, H., Kodani, M., Yasuda, K., Hitsuda, Y., and Shimizu, E. (2004) *J Cancer Res Clin Oncol* **130**, 146-152
64. Mori, Y., Ishida, W., Bhattacharyya, S., Li, Y., Platanias, L. C., and Varga, J. (2004) *Arthritis Rheum* **50**, 4008-4021
65. Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J., and Hill, C. S. (2002) *Mol Pharmacol* **62**, 65-74
66. Dubois, C. M., Laprise, M. H., Blanchette, F., Gentry, L. E., and Leduc, R. (1995) *J Biol Chem* **270**, 10618-10624
67. Dubois, C. M., Blanchette, F., Laprise, M. H., Leduc, R., Grondin, F., and Seidah, N. G. (2001) *Am J Pathol* **158**, 305-316
68. Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, A. J., and Thomas, G. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7293-7298
69. Laprise, M. H., Grondin, F., Cayer, P., McDonald, P. P., and Dubois, C. M. (2002) *Blood* **100**, 3578-3587

70. Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D., Schafer, W., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., and Klenk, H. D. (1994) *Biochimie* **76**, 217-225
71. Chua, C. C., Hamdy, R. C., and Chua, B. H. (2000) *Biochim Biophys Acta* **1497**, 69-76
72. Donovan, D., Harmey, J. H., Toomey, D., Osborne, D. H., Redmond, H. P., and Bouchier-Hayes, D. J. (1997) *Ann Surg Oncol* **4**, 621-627
73. Nakanishi, Y., Kodama, J., Yoshinouchi, M., Tokumo, K., Kamimura, S., Okuda, H., and Kudo, T. (1997) *Int J Gynecol Pathol* **16**, 256-262
74. Sugano, Y., Matsuzaki, K., Tahashi, Y., Furukawa, F., Mori, S., Yamagata, H., Yoshida, K., Matsushita, M., Nishizawa, M., Fujisawa, J., and Inoue, K. (2003) *Oncogene* **22**, 2309-2321
75. Yeo, E. J., Chun, Y. S., Cho, Y. S., Kim, J., Lee, J. C., Kim, M. S., and Park, J. W. (2003) *J Natl Cancer Inst* **95**, 516-525
76. Hirota, K., Fukuda, R., Takabuchi, S., Kizaka-Kondoh, S., Adachi, T., Fukuda, K., and Semenza, G. L. (2004) *J Biol Chem* **279**, 41521-41528
77. Metzen, E., Zhou, J., Jelkmann, W., Fandrey, J., and Brune, B. (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 3470-3481
78. Zhou, J., Schmid, T., and Brune, B. (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 2216-2225
79. Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., and Poellinger, L. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5667-5672
80. Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., and Bunn, H. F. (1996) *J Biol Chem* **271**, 32253-32259
81. Gerald, D., Berra, E., Frapart, Y. M., Chan, D. A., Giaccia, A. J., Mansuy, D., Pouyssegur, J., Yaniv, M., and Mechta-Grigoriou, F. (2004) *Cell* **118**, 781-794

82. Metzen, E., Stiehl, D. P., Doege, K., Marxsen, J. H., Hellwig-Burgel, T., and Jelkmann, W. (2004) *Biochem J*
83. Herrera, B., Murillo, M. M., Alvarez-Barrientos, A., Beltran, J., Fernandez, M., and Fabregat, I. (2004) *Free Radic Biol Med* **36**, 16-26
84. Chiu, C., Maddock, D. A., Zhang, Q., Souza, K. P., Townsend, A. R., and Wan, Y. (2001) *Int J Mol Med* **8**, 251-255
85. Chang, H. C., Liu, L. T., and Hung, W. C. (2004) *Cell Signal* **16**, 675-679
86. Rafty, L. A., and Khachigian, L. M. (2000) *J Biol Chem* **275**, 11478-11483
87. Chen, J., Halappanavar, S. S., St-Germain, J. R., Tsang, B. K., and Li, Q. (2004) *Cell Mol Life Sci* **61**, 1675-1683
88. Hayashida, T., Decaestecker, M., and Schnaper, H. W. (2003) *Faseb J* **17**, 1576-1578
89. Runyan, C. E., Schnaper, H. W., and Poncelet, A. C. (2004) *J Biol Chem* **279**, 2632-2639
90. Zhong, H., Agani, F., Baccala, A. A., Laughner, E., Rioseco-Camacho, N., Isaacs, W. B., Simons, J. W., and Semenza, G. L. (1998) *Cancer Res* **58**, 5280-5284
91. Vleugel, M. M., Greijer, A. E., Shvarts, A., van der Groep, P., van Berkel, M., Aarbodem, Y., van Tinteren, H., Harris, A. L., van Diest, P. J., and van der Wall, E. (2005) *J Clin Pathol* **58**, 172-177
92. Blancher, C., Moore, J. W., Talks, K. L., Houlbrook, S., and Harris, A. L. (2000) *Cancer Res* **60**, 7106-7113
93. Hasegawa, Y., Takanashi, S., Kanehira, Y., Tsushima, T., Imai, T., and Okumura, K. (2001) *Cancer* **91**, 964-971

94. Cheng, M., Watson, P. H., Paterson, J. A., Seidah, N., Chretien, M., and Shiu, R. P. (1997) *Int J Cancer* **71**, 966-971
95. Mbikay, M., Sirois, F., Yao, J., Seidah, N. G., and Chretien, M. (1997) *Br J Cancer* **75**, 1509-1514
96. Coombes, R. C., Barrett-Lee, P., and Luqmani, Y. (1990) *J Steroid Biochem Mol Biol* **37**, 833-836
97. Muraoka-Cook, R. S., Kurokawa, H., Koh, Y., Forbes, J. T., Roebuck, L. R., Barcellos-Hoff, M. H., Moody, S. E., Chodosh, L. A., and Arteaga, C. L. (2004) *Cancer Res* **64**, 9002-9011

## **DISCUSSION :**

Le cancer est une pathologie très complexe qui est influencée par l'action d'un ensemble de protéines qui modulent le déroulement de chacune des étapes de la progression tumorale. Depuis la découverte de la convertase furine et l'identification de ses préférences de clivage, divers groupes de recherche ont suggéré la participation de cette convertase dans le processus de tumorigenèse. En fait, l'analyse de la séquence de différentes enzymes et protéines impliquées dans la croissance des cellules tumorales, l'invasion, l'angiogenèse et la formation de métastases suggérait que plusieurs d'entre elles sont des substrats potentiels de la furine (Khatib et al., 2002). C'est grâce à l'établissement (CHO RPE.40) et à la découverte (LoVo) de lignées cellulaires déficientes en furine ainsi qu'au développement d'inhibiteurs ( $\alpha$ 1-PDX) que la participation de cette convertase dans la maturation de précurseurs pro-tumorigéniques a pu être confirmée (Inocencio et al., 1993; Jean et al., 1998; Takahashi et al., 1993).

L'acquisition d'un phénotype invasif/métastatique est un élément essentiel à la progression tumorale et l'activation des MMPs joue un rôle majeur dans l'acquisition des ces capacités. L'un des substrats de la furine relié à l'invasion tumorale le mieux étudié est la MT1-MMP (Bassi et al., 2000; Khatib et al., 2002). L'inhibition de la furine par l' $\alpha$ 1-PDX, un inhibiteur protéique de cette convertase, a engendré une diminution marquée des niveaux de maturation de la MT1-MMP et de la capacité d'invasion de lignées cellulaires issues de carcinomes de la tête et du cou (Bassi et al., 2001a). De façon complémentaire, les niveaux d'expression endogènes de l'ARNm et de la protéine furine

ont été associés à l'agressivité de ces lignées cellulaires et à l'augmentation des niveaux de maturation de la MT1-MMP (Bassi et al., 2003). Ainsi, cette protéase est considérée en tant que lien qui unit la furine à ses effets sur la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion tumorale. La participation de la furine dans la maturation de la MT1-MMP chez différents types cellulaires, dont les cellules issues d'un fibrosarcome humain HT1080, a été confirmée grâce à des essais de mutagenèse dirigée et d'inhibition (Maquoi et al., 1998; Yana and Weiss, 2000). Toutefois, il a également été rapporté que l'activation de la MT1-MMP peut être indépendante de l'activité de la furine, du moins, chez certains types cellulaires tels que les cellules dermales de lapin et les cellules de tumeur du sein MCF7 (Rozanov et al., 2001; Sato et al., 1999). Dans cette étude, l'utilisation d'un inhibiteur de type hydroxamate a permis de bloquer l'activation de la MT1-MMP chez les cellules MCF7 mais pas chez les cellules HT1080, indiquant l'implication de protéases de type matrixine (MMP) dans le mécanisme d'activation de la MT1-MMP indépendant de la furine (Rozanov et al., 2001). Nos résultats, obtenus par buvardage de type Western, ne révèlent aucun changement significatif de l'état de maturation de la MT1-MMP entre les cellules LoVo de type sauvage ou contrôles (déficientes en furine) et les cellules LoVo complémentées avec la furine (figure 3 du chapitre I). Cette observation suggère donc que la maturation de la MT1-MMP chez les cellules LoVo ne requiert pas l'activité protéolytique de la furine. À ce niveau, il aurait été intéressant d'utiliser des hydroxamates afin de démontrer si un mécanisme similaire d'activation de la MT1-MMP est impliqué chez les cellules LoVo et MCF7. À ce propos, une publication récente suggère que chez les cellules LoVo, l'activation de la MT1-MMP a lieu via un mécanisme autocatalytique, un phénomène répandu au sein des MMP. Mais

étant donné l'absence d'outils adéquats, tels qu'un inhibiteur spécifique pour cette MMP, cette proposition n'a pu être confirmée (Deryugina et al., 2004).

Puisque dans nos travaux, la complémentation de cellules LoVo avec la furine de type sauvage engendre une augmentation de la capacité invasive sans modification des niveaux de maturation de la MT1-MMP, l'implication d'autres substrats de la furine a été envisagée. Nous avons démontré au chapitre I que la hausse des niveaux de TGF $\beta$ 1 bioactif en réponse à l'expression de furine active était responsable de l'augmentation de la capacité invasive des cellules LoVo, et ce via l'augmentation de l'expression de la MMP-2. Cette induction des niveaux de la MMP-2 en réponse au TGF $\beta$ 1 exogène a aussi été observée au laboratoire chez les cellules HT1080 (résultat non illustré), une lignée cellulaire chez laquelle la maturation de la MT1-MMP est dépendante de la furine. Ces observations suggèrent qu'il existe, chez certains types cellulaires, deux mécanismes d'action complémentaires/alternatifs responsables des effets de la furine sur l'invasion tumorale, l'un impliquant la maturation de la MT1-MMP et l'autre du TGF $\beta$ 1.

Bien qu'il a été démontré que le TGF $\beta$ 1 stimule l'expression de la MMP-2 chez une variété de cellules cancéreuses, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation des niveaux de cette protéase sont peu connus. Il semblerait que selon le type cellulaire, la MMP-2 peut être modulée lors de la synthèse ou encore suite à la sécrétion. Par analyse de type PCR, nous n'avons pas détecté de variations significatives des niveaux d'ARNm encodant la gélatinase A chez les cellules LoVo stimulées au TGF $\beta$ 1. Une absence d'effet transcriptionnel a également été observée chez d'autres types

cellulaires, dont des cellules cancéreuses de la prostate. Les travaux du groupe de Sehgal suggèrent plutôt un effet post-traductionnel du TGF $\beta$ 1 qui consiste en un ralentissement du déclin de l'activité enzymatique de la MMP-2 sécrétée par ces cellules tumorales (Sehgal and Thompson, 1999). Toutefois, la stimulation au TGF $\beta$ 1 de lignées cellulaires de cancer du pancréas, PANC-1 et IMIM-PC1, occasionne une augmentation des niveaux d'ARNm et de l'activité de la MMP-2, telle qu'observée par buvardage de type Northern et zymographie (Ellenrieder et al., 2001). L'étude du promoteur de cette protéase pourrait nous fournir des informations supplémentaires concernant la régulation transcriptionnelle de la MMP-2 par le TGF $\beta$ 1. En ce sens, il a été démontré que la prostaglandine PGE<sub>2</sub> induit la transcription de la MMP-2 chez les cellules de cancer pancréatique PANC-1 via l'action du ETS-1 (Ito et al., 2004). De façon intéressante, le TGF $\beta$ 1 peut induire l'expression de ce facteur de transcription de même que la synthèse d'ARNm de la MMP-2 chez ces cellules (Ellenrieder et al., 2001; Iwasaka-Yagi et al., 2001). Face à ces résultats, nous pourrions émettre l'hypothèse voulant que le facteur de transcription EST-1 participe à l'induction de la MMP-2 par le TGF $\beta$ 1.

Différentes voies de signalisation peuvent être impliquées dans l'induction de la MMP-2 par le TGF $\beta$ 1. Par exemple, chez une lignée épithéliale du sein spontanément immortalisée (MCF10A), l'expression de la MMP-2 en réponse au TGF $\beta$ 1 repose sur l'activation de la voie de signalisation de la MAPK p38 (Kim et al., 2004). Chez des cellules mésangiales de rat, la surexpression de Smad2, mais non de Smad3, induit l'expression de la MMP-2, mais de façon moindre que la stimulation exogène au TGF $\beta$ 1 (Yang et al., 2003). De façon contraire, la surexpression de Smad7, l'inhibiteur endogène



de la voie des Smads, réprime les effets du TGF $\beta$ 1 en ce qui concerne l'expression de la MMP-2. Ainsi, à la lumière de ces observations, le TGF $\beta$ 1 semblent emprunter différentes voies de signalisation afin de transmettre ses effets. Il serait intéressant de vérifier si les divergences observées en ce qui a trait à l'expression de la MMP-2 en réponse au TGF $\beta$ 1 sont attribuables à l'activation de différentes voies de signalisation. Également, en plus d'induire l'expression de la MMP-2, le TGF $\beta$ 1 réprime l'expression de son inhibiteur, le TIMP-2, chez des cellules de glioblastomes (Wick et al., 2001). Puisqu'une balance entre les niveaux de MMPs et d'inhibiteurs doit exister afin de créer un milieu favorable à l'invasion, il serait pertinent d'étudier l'effet du TGF $\beta$ 1 sur l'expression du TIMP-2 chez le modèle de cellules LoVo utilisé au chapitre I.

Ainsi, les travaux présentés au chapitre I révèlent un nouveau mécanisme d'action de la furine dans le processus d'invasion tumorale. La participation du TGF $\beta$ 1 dans ce processus nous permet de proposer l'existence d'une boucle d'amplification inédite qui contribue aux effets pro-tumorigénique de la furine (figure 7 du chapitre I). Cette boucle est initiée par la production, via l'activité endoprotéolytique de la furine, de TGF $\beta$ 1 bioactif qui induit l'expression de la MMP-2. Par la suite, la MT1-MMP, activée de façon dépendante ou indépendante de la furine selon le type cellulaire étudié, active la MMP-2. Cette dernière favorise directement l'invasion cellulaire et active à son tour le TGF $\beta$ 1 qui est reconnu en tant qu'inducteur de l'expression de son enzyme de conversion, soit la furine.

Les acteurs proposés dans cette boucle d'activation sont cités à titre d'exemple. Étant donné la panoplie de précurseurs pouvant être clivés par la furine, il est concevable de penser que d'autres substrats pourraient participer à l'invasion tumorale induite par cette convertase. Entre autres, la furine est capable d'activer la sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines (Lehmann et al., 1996; Lissitzky et al., 2000). L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est étroitement liée à la capacité d'invasion des cellules tumorales en facilitant leur adhésion aux éléments de la matrice extracellulaire et aussi en liant la MMP-2, ce qui permet son ancrage/exposition au front de migration des cellules (Chattopadhyay et al., 2001; Leroy-Dudal et al., 2005). Les autres formes de MMP membranaires, soit les MT-MMP de 2 à 6, possèdent également une séquence de reconnaissance furine à leur site d'activation et peuvent activer, *in vitro*, la pro-MMP-2 (Kolkenbrock et al., 1997; Llano et al., 1999; Pei, 1999; Velasco et al., 2000). Cependant, il n'existe pas d'évidence qui indique que les cellules LoVo expriment ces formes de MMP. La stromélysine-3 (MMP-11) peut aussi être activée par la furine et son expression coïncide avec l'augmentation de la capacité invasive de cellules tumorales (Pei and Weiss, 1995; Tetu et al., 1998). Toutefois, bien que surexprimée chez des cancers humains du pancréas, du sein et de la peau, la stromélysine-3 n'est pas exprimée par les cellules LoVo et ne peut donc pas, dans ce cas précis, contribuer à l'augmentation de la capacité invasive des cellules complémentées génétiquement avec la furine (Basset et al., 1990; Pei and Weiss, 1995; Unden et al., 1996; von Marschall et al., 1998).

Les résultats obtenus de différentes approches (ex : surexpression de la furine ou inhibition de son activité) démontrent, jusqu'à maintenant, que la furine participe à la

progression tumorale en induisant l'invasion cellulaire. Il existe cependant une étude qui indique que l'inhibition de la furine par l'expression d' $\alpha 1$ -PDX entraîne une augmentation de la capacité de migration et d'invasion des cellules humaines de carcinome de colon HT-29 ainsi que du développement de métastases chez un modèle de rats immuno-supprimés (Nejjari et al., 2004). Cette étude présente toutefois quelques limites. Entre autres, la capacité d'invasion et de migration d'un seul clone cellulaire exprimant l' $\alpha 1$ -PDX a été vérifiée. L'utilisation de l'inhibiteur chimique Dec-RVCR-CH<sub>2</sub>Cl, même à de grandes concentrations (de 100 à 150  $\mu$ M), n'a pu induire la capacité de migration des cellules HT-29 à des niveaux aussi élevés que ceux obtenus suite à l'expression ectopique d' $\alpha 1$ -PDX. Les résultats présentés dans cet article sont en contradiction avec ceux obtenus par l'équipe du Dr Seidah en utilisant le même modèle cellulaire (Khatib et al., 2001). Cette étude démontrait une diminution de la capacité invasive des cellules HT-29 surexprimant l' $\alpha 1$ -PDX. Une diminution de la tumorigénicité de ces cellules avait aussi été détectée lorsqu'elles étaient injectées chez des souris immuno-déficientes. L'expression d' $\alpha 1$ -PDX chez des cellules de carcinome de colon, de tumeurs de la tête et du cou et d'astrocytomas a entraîné, dans tous les cas, une inhibition de la capacité invasive (Bassi et al., 2001a; Khatib et al., 2001; Mercapide et al., 2002). Il serait donc important de comprendre la cause des divergences qui existent entre les résultats obtenus par deux équipes de recherche différentes en utilisant le même modèle cellulaire. Bien que ces différences puissent être attribuables à une hétérogénéité résultant du processus de sélection clonale, ces observations soulèvent la possibilité d'un rôle plus complexe pour la furine dans le processus d'invasion tumorale que ce qui a été suggéré jusqu'à maintenant.

Les travaux présentés au chapitre I se concentrent sur la production de MMP par les cellules tumorales en réponse à une stimulation autocrine de TGF $\beta$ 1. Plusieurs évidences indiquent que la MMP-2, qui participe à l'invasion des cellules tumorales, peut être sécrétée par les cellules du tissu stromal entourant la tumeur et par les cellules inflammatoires infiltrant la tumeur (ex : macrophages) (Lin and Pollard, 2004). Également, la production de MMP-2 par les cellules endothéliales constitue un événement important de leur migration et du processus d'angiogenèse qui s'en suit (Almholt and Johnsen, 2003). Étant donné que le développement d'une tumeur est régi par de multiples interactions entre les différents types cellulaires qui la composent, il serait intéressant d'examiner les effets de la production de TGF $\beta$ 1 bioactif, sécrété par les cellules tumorales, sur la production de MMP-2 par les cellules stromales, inflammatoires et endothéliales. Ainsi, ces expériences contribueraient à améliorer la compréhension globale du rôle de la furine dans la tumorigenèse, via la maturation de substrats tels que le TGF $\beta$ 1.

De façon générale, la furine est détectée à des niveaux très faibles dans les tissus sains. Par conséquent, la surexpression caractéristique de la furine chez les cancers du sein, des poumons, de la tête et du cou et de glioblastomes appuie l'hypothèse voulant que la furine joue un rôle dans la progression de la pathologie du cancer (Bassi et al., 2003; Cheng et al., 1997; Mbikay et al., 1997a; Mercapide et al., 2002). Plusieurs études suggèrent que l'induction de l'expression de la furine permet la maturation de précurseurs pro-tumorigéniques à des niveaux favorisant le développement tumoral. Cependant, peu

d'informations sont disponibles en ce qui concerne les mécanismes qui contrôlent l'expression du gène de la furine en conditions tumorales. Ainsi, les résultats présentés au chapitre II révèlent un nouveau mécanisme par lequel l'expression de la furine peut être augmentée par l'hypoxie, un inducteur général de la tumorigenèse.

Ce mécanisme implique la participation du facteur de transcription HIF-1. Des sites de liaison putatifs pour ce facteur ont été détectés dans chacun des trois promoteurs régulant l'expression du gène de la furine. Tous ces promoteurs possèdent au moins un site minimal de liaison pour le HIF-1 (HBS) qui correspond parfaitement à la séquence canonique RCGTG où R=A/G. Les promoteurs P1 et P1B exhibent également des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) formés d'un HBS et d'un HAS qui correspondent à la séquence optimale pour la liaison du HIF-1 (figure 2, chapitre II). Cependant, le promoteur P1 s'est révélé être le plus sensible en réponse à l'hypoxie. Ainsi, nos résultats appuient les observations qui indiquent que le promoteur P1, contrairement aux deux autres, est un promoteur inductible. En fait, ce promoteur est celui qui répond le plus fortement à la transactivation par les facteurs de transcription C/EBP $\beta$ , Smad et GATA-1, et ce malgré la présence de sites de liaison putatifs pour ces facteurs dans les promoteurs P1A et P1B (Ayoubi et al., 1994; Blanchette et al., 2001b; Laprise et al., 2002).

Nos résultats démontrent que l'hypoxie stimule, bien que légèrement, l'activité des promoteurs P1A et P1B avec des taux d'induction respectifs de 1,8 et 1,4 fois. Cette stimulation contribue possiblement à l'induction des niveaux d'ARNm *fur* en réponse à l'hypoxie. Des études supplémentaires seraient nécessaires afin de vérifier cette hypothèse. En se basant sur le fait que chacun de promoteur engendre la production

d'isoformes distincts d'ARNm (Ayoubi et al., 1994), les niveaux d'expression de chacune de ces formes à la suite d'une exposition à l'hypoxie pourraient être mesurés par RT-PCR. Puisque l'activité constitutive des différents promoteurs de la furine semble varier en fonction du type cellulaire, il serait également intéressant de mesurer leur activité respective en réponse à l'hypoxie chez différentes lignées cellulaires dont les cellules pulmonaires NCI-H82 chez lesquelles le P1A est le promoteur le plus actif, comparativement aux cellules HepG2 où le P1 possède l'activité basale prédominante (Ayoubi et al., 1994; Blanchette et al., 2001b).

Des études supplémentaires sont aussi requises afin de déterminer si l'activité des promoteurs P1A et P1B en hypoxie est induite par le HIF-1. En fait, depuis la découverte du HIF-1, il a été démontré que l'hypoxie engendre l'activation d'autres facteurs de transcription, tels que le NF- $\kappa$ B et l'AP-1 (Faller, 1999). Des études de promoteurs réalisées chez les cellules Hepa-1 c4, qui sont déficientes en HIF-1 fonctionnel, ont clairement démontré le caractère essentiel du complexe HIF-1 en ce qui concerne l'induction hypoxique du promoteur P1. Il faut cependant se rappeler que le complexe HIF-1 peut être constitué des isoformes HIF-1 $\alpha$  ou HIF-2 $\alpha$  en association avec la sous-unité HIF-1 $\beta$ , et que les différents hétérodimères lient la même séquence au niveau de l'ADN (Tian et al., 1997). Les cellules Hepa-1 c4, contrairement aux cellules parentales Hepa-1 c1c7, sont déficientes en HIF-1 $\beta$ , ce qui prévient la formation de tous complexes fonctionnels de HIF-1 (Wood et al., 1996). De plus, bien que l'expression du HIF-2 $\alpha$  soit restreinte chez les tissus normaux, cette isoforme est détectée chez plusieurs types de cellules cancéreuses, incluant des cellules tumorales hépatocellulaires (Bangoura et al.,

2004). Il serait donc probable que les cellules d'hépatomes de souris Hepa-1 expriment le HIF-2 $\alpha$ . Ainsi, les résultats obtenus à la figure 4C du chapitre II ne permettent pas d'exclure la possibilité que le HIF-2 $\alpha$  puisse, en association avec la sous-unité  $\beta$ , transactiver le promoteur P1-*fur*.

L'induction de l'expression de la furine par l'hypoxie/HIF-1 coïncide avec une augmentation de la maturation des substrats MT1-MMP et TGF $\beta$ 1 (figure 7, chapitre II). Ces substrats, tout comme la majorité des précurseurs pro-tumorigéniques qui sont exprimés par les cellules tumorales, sont activés lors de leur passage dans la voie de sécrétion constitutive. Parmi les différentes PC qui participent au processus de conversion protéolytique dans cette voie (furine, PACE-4, PC5/PC6 et PC7), seules les convertases furine, PACE-4 et PC7 sont exprimées chez notre modèle cellulaire HepG2 (Mori et al., 1999). Cependant, contrairement à la furine, dont l'expression est augmentée de façon marquée en réponse à l'hypoxie, les niveaux de messagers de la PACE-4 et de la PC-7 ne sont pas significativement modulés suite à une privation d'oxygène (figure 1, chapitre II). Ces résultats permettent de tirer 2 conclusions : 1) que l'induction de l'expression de convertases autres que la furine ne contribue pas à l'augmentation de la production, en hypoxie, des formes bioactives des substrats pro-tumorigéniques MT1-MMP et TGF $\beta$ 1 et 2) que l'hypoxie n'est pas un stimulus qui contrôle l'expression des PC de façon générale, et ce malgré le fait que plusieurs membres de la famille des PC sont surexprimés chez différents types de cancers.

En plus de cliver la MT1-MMP et le TGF $\beta$ 1, plusieurs médiateurs impliqués dans la progression tumorale sont des substrats de la furine, ce qui supporte l'hypothèse voulant que la surexpression de la furine à l'intérieur des régions hypoxiques d'une tumeur puisse entraîner des conséquences importantes sur la croissance tumorale, l'invasion et l'angiogenèse. Il serait donc indiqué de poursuivre l'étude présentée au chapitre II en vérifiant l'implication biologique/pathologique de la régulation de la furine en hypoxie sur chacune des étapes de la carcinogenèse. Nous pourrions comparer les effets de l'hypoxie sur la capacité invasive, en chambre de Boyden, de cellules tumorales de type sauvage ou qui expriment l' $\alpha$ 1-PDX de façon stable. Nous pourrions également utiliser le milieu conditionné dérivé de ces cellules à plusieurs fins. D'abord, des cellules tumorales pourraient y être cultivées afin d'étudier l'impact de la production de furine en conditions hypoxiques sur leur prolifération. Une expérience similaire pourrait être réalisée avec des cellules endothéliales afin de déterminer si l'activité protéolytique de la furine en hypoxie stimule leur prolifération, une étape nécessaire à l'angiogenèse tumorale. Finalement, des essais *in vitro* de formation de capillaires par les cellules endothéliales en réponse aux différents milieux conditionnés permettraient d'évaluer le rôle pro-angiogénique de la furine.

Les travaux présentés au chapitre II décrivent donc un nouvel aspect du rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la progression tumorale qui consiste en une augmentation de la maturation/activation de proprotéines. Ainsi, la furine s'ajoute à la liste de gènes dont l'expression est contrôlée par ce facteur de transcription. Le HIF-1 est aujourd'hui reconnu en tant que médiateur clé de la réponse d'adaptation cellulaire à l'hypoxie



(Semenza, 2003). Depuis la découverte de ce facteur de transcription, un engouement s'est développé au sein de la communauté scientifique en ce qui concerne les mécanismes qui régulent ses fonctions. L'une des percées scientifiques les plus significatives ayant trait à la régulation du HIF-1 est la découverte que des stimuli physiologiques autres que l'hypoxie peuvent induire son expression et son activité. Les travaux présentés au chapitre III s'inscrivent à cette nouvelle voie de recherche et décrivent, pour la première fois, des mécanismes par lesquels le TGF $\beta$ 1, un substrat de la furine, induit l'accumulation et l'activité du HIF-1 en normoxie.

Nos résultats indiquent qu'au moins deux mécanismes sont impliqués dans la régulation du facteur de transcription HIF-1 par le TGF $\beta$ 1. Le premier étant via une augmentation de la transcription et le second via la stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$ . Les résultats présentés à la figure 2A du chapitre III indiquent que la stimulation de cellules HepG2 au TGF $\beta$ 1 provoque une augmentation des niveaux d'ARNm du HIF-1 $\alpha$ . Le pré-traitement des cellules avec de l'actinomycine D, un inhibiteur de la synthèse d'ARN, indique un effet transcriptionnel du TGF $\beta$ 1 (figure 2B du chapitre III). Toutefois, ces résultats ne nous permettent pas de conclure que le TGF $\beta$ 1 agit directement sur la transcription du gène du HIF-1 $\alpha$ . En fait, le TGF $\beta$ 1 pourrait avoir un effet indirect en modulant la transcription d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la stabilisation des transcrits du HIF-1 $\alpha$  ou dans les événements contrôlant la transcription du HIF-1 $\alpha$ . Ainsi, des études de demie-vie des messagers du HIF-1 $\alpha$  ainsi que l'étude de son promoteur permettraient de déterminer si les effets transcriptionnels du TGF $\beta$ 1 affectent la transcription et/ou la stabilisation de l'ARNm du HIF-1 $\alpha$ . Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire en

utilisant une construction luciférase qui comprend un fragment d'environ 600 pb du promoteur du HIF-1 $\alpha$  (région -572/+32) (Page et al., 2002), démontrent un effet transcriptionnel du TGF $\beta$ 1 sur l'expression du HIF-1 $\alpha$ . Toutefois, l'induction de l'activité luciférase mesurée en réponse au TGF $\beta$ 1 est relativement faible (environ 1,5 fois) comparativement à l'induction de l'expression de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$  observée par buvargade de type Northern (figure 2A du chapitre III). Il se peut donc que ce court fragment de promoteur ne contienne pas tous les éléments « en *cis* » nécessaires à la transcription optimale du gène du HIF-1 $\alpha$  suite à une stimulation au TGF $\beta$ 1. Il se peut également que la transactivation du gène du HIF-1 $\alpha$  ne contribue que pour une fraction de l'effet du TGF $\beta$ 1 sur la modulation des niveaux d'ARNm de ce facteur de transcription. Le clonage du promoteur entier du HIF-1 $\alpha$  s'avèrera donc être un outil essentiel à la suite des travaux concernant la régulation de l'expression de messagers du HIF-1 $\alpha$  par le TGF $\beta$ 1.

Seul un faible nombre de stimuli affectent l'expression de messagers du HIF-1 $\alpha$ . Le TGF $\beta$ 1 s'ajoute donc à cette catégorie limitée de facteurs qui comprend le LPS, les hormones vasculaires thrombine et angiotensine ainsi que le facteur de croissance HGF (Blouin et al., 2004; Page et al., 2002; Tacchini et al., 2001). La majorité des stimuli non-hypoxiques modulent la traduction du HIF-1 $\alpha$  via l'activation de la voie de la PI3K (Dery et al., 2005). L'utilisation d'inhibiteurs chimiques de la voie de la PI3K a indiqué la participation de cette dernière dans l'accumulation de la protéine HIF-1 $\alpha$  par le TGF $\beta$ 1. Ainsi, la régulation traductionnelle du HIF-1 $\alpha$  par ce facteur de croissance est envisageable. Des essais d'incorporation de S<sup>35</sup> jumelés à l'immunoprécipitation du HIF-

1 $\alpha$  permettrait de démontrer si la stimulation au TGF $\beta$ 1 induit la synthèse protéique de cette sous-unité du HIF-1.

Au chapitre III, nous nous sommes plutôt attardés à comprendre les événements qui régissent la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  par le TGF $\beta$ 1, un mécanisme d'action qui diverge de ceux empruntés de façon générale par les stimuli non-hypoxiques. Il est connu que la dégradation du HIF-1 $\alpha$  en conditions normoxiques repose sur des modifications post-traductionnelles, telles que l'hydroxylation des prolines 402 et 564, situées dans le ODDD, qui permet la liaison du HIF-1 $\alpha$  à la machinerie d'ubiquitination (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). La prolongation de la demie-vie de la protéine HIF-1 $\alpha$  en réponse au TGF $\beta$ 1 (figure 2D) a été associée à une diminution des niveaux d'hydroxylation et à l'induction de la stabilité d'une protéine de fusion arborant le domaine ODDD du HIF-1 $\alpha$  (figure 2E). De façon intéressante, ces observations corrèlent avec une inhibition spécifique de l'expression de la protéine et de l'ARNm de la prolyl hydroxylase PHD2 (figure 3). Le groupe du Dr Pouyssegur a identifié cette PHD en tant que senseur des niveaux d'oxygène cellulaire responsable de l'hydroxylation du HIF-1 $\alpha$  *in vivo* (Berra et al., 2003). Conséquemment, la réduction marquée et persistante des niveaux d'expression de la PHD2 par le TGF $\beta$ 1, en association avec l'inhibition de l'hydroxylation des prolines contenues dans le ODDD du HIF-1 $\alpha$ , suggèrent fortement que l'inhibition de l'expression de la PHD2 constitue le mécanisme par lequel le TGF $\beta$ 1 induit la stabilisation du HIF-1 $\alpha$ . À ce niveau, des confirmations additionnelles quant à l'état d'hydroxylation du HIF-1 $\alpha$  suite à une stimulation au TGF $\beta$ 1 pourraient être obtenues en utilisant un anticorps récemment développé par le laboratoire du Dr Giaccia

qui est spécifiquement dirigé contre la forme hydroxylée à la proline 564 du HIF-1 $\alpha$  (Chan et al., 2002). Également, les corrélations établies entre l'état d'hydroxylation/stabilisation du HIF-1 $\alpha$  et l'inhibition de l'expression de la PHD2 par le TGF $\beta$ 1 pourraient être corroborées en transfectant la séquence complémentaire d'ADN encodant la PHD2. Dans le cas où l'inhibition de l'expression de la PHD2 est responsable des effets stabilisateurs du TGF $\beta$ 1 sur le HIF-1 $\alpha$ , la surexpression de l'hydroxylase devrait se traduire par le maintien des niveaux d'hydroxylation et une perte de la stabilité du HIF-1 $\alpha$ , et ce malgré la présence du TGF $\beta$ 1. Cette expérience fournirait également des informations quant à la contribution exacte de ce mécanisme d'action sur l'accumulation du HIF-1 $\alpha$ .

À l'exception de l'hypoxie, la capacité à inhiber l'expression de la PHD2 semble être une fonction associée de façon particulière au TGF $\beta$ 1. En fait, aucune autre étude n'a démontré l'existence d'un lien entre l'induction du HIF-1 $\alpha$  par des stimuli non-hypoxiques et l'inhibition de l'expression des prolyls hydroxylases. Jusqu'à maintenant, seulement deux stimuli autres que l'hypoxie, soit le donneur de NO s-nitrosoglutathione et l'activation de récepteurs muscariniques M1 et M3, sont reconnus pour induire l'accumulation du HIF-1 $\alpha$  en augmentant la stabilité de la protéine (Hirota et al., 2004; Metzen et al., 2003b). Ces études indiquent cependant que la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  serait engendrée par l'inhibition de l'activité et non de l'expression des PHD. Des études portant sur l'activité du promoteur inductible de la PHD2 ont été entreprises au laboratoire. Les résultats préliminaires obtenus d'essais luciférase révèlent que le TGF $\beta$ 1 inhibe l'activité transcriptionnelle du promoteur de la PHD2, ce qui corrèle avec la

diminution des niveaux d'ARNm observée en réponse à ce facteur de croissance (figure 3B, chapitre III). Des expériences de délétion et de mutagenèse dirigée seront toutefois nécessaires afin de déterminer les éléments « en *cis* » au sein du promoteur qui sont nécessaires à l'inhibition de l'expression de l'ARNm PHD2 par le TGFβ1. En plus des prolyls hydroxylases, d'autres protéines participent au processus de dégradation du HIF-1α en normoxie. Parmi celles-ci, on retrouve le pVHL, qui permet la liaison de la forme hydroxylée du HIF-1α à la machinerie d'ubiquitination, ainsi que l'acétylase ARD1, dont l'activité contrôle la liaison du pVHL au HIF-1α (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Jeong et al., 2002). L'expression de ces protéines pourrait être examinée afin de déterminer si la stabilisation du HIF-1α en réponse au TGFβ1 implique la régulation coordonnée d'effecteurs.

Il est connu que les niveaux d'ARNm de la PHD2 sont augmentés en hypoxie via le HIF-1, ce qui engendre un mécanisme autorégulateur qui est sous le contrôle des niveaux d'oxygène (Metzen et al., 2004). L'équipe du Dr Van Obberghen s'est récemment intéressée au rôle du HIF-1 induit par l'insuline et le IGF-1, deux inducteurs du HIF-1α en conditions normoxiques, sur l'expression des prolyls hydroxylases (Treins et al., 2005). Leurs travaux révèlent que ces stimuli n'affectent pas les niveaux d'expression de la PHD1. Ils augmentent toutefois de façon légère mais significative les niveaux d'ARNm de la PHD2, la PHD3 n'étant pas détectable chez les cellules épithéliales pigmentaires de la rétine. Les composés qui imitent les effets de l'hypoxie, tels que le CoCl<sub>2</sub> et la desferroxamine, ont été utilisés en guise de comparaison. Ces agents stimulent efficacement l'expression d'ARNm PHD2, ce qui suggère que la régulation

transcriptionnelle de la PHD2 par le HIF-1 nécessite la participation de cofacteurs qui ne sont pas efficacement recrutés par ces facteurs de croissance. Nos résultats démontrent un effet inhibiteur soutenu du TGF $\beta$ 1 en ce qui concerne l'expression de la protéine PHD2 (figure 3A du chapitre III). Toutefois, dans quelques rares cas, une augmentation des niveaux de la protéine PHD2 a été observée après 16h de stimulation au TGF $\beta$ 1 (résultats non illustrés dans cette thèse). L'analyse par PCR en temps réel démontre de façon répétitive et significative une hausse des niveaux d'ARNm de la PHD2 suivant une stimulation de 16h au TGF $\beta$ 1 (figure 3B). De façon collective, ces résultats suggèrent qu'à court terme, l'inhibition de la transcription de la PHD2 constitue l'effet dominant du TGF $\beta$ 1, tandis qu'à long terme, l'accumulation du HIF-1 contrecarre l'effet inhibiteur du TGF $\beta$ 1 sur l'expression de la PHD2. À la lumière de ces observations, il est tentant de supposer l'existence d'un tel mécanisme d'autorégulation qui permettrait à long terme de contenir les effets du TGF $\beta$ 1 sur l'expression du HIF-1. Il serait donc intéressant de vérifier l'impact du TGF $\beta$ 1 sur l'expression de la PHD2 sur une échelle de temps plus longue que celle utilisée dans nos travaux.

Tel que mentionné précédemment, le TGF $\beta$ 1 bioactif est issu du clivage d'une molécule précurseure par la furine (Dubois et al., 2001; Dubois et al., 1995). Nous avons tiré avantage de cette observation afin de vérifier si le TGF $\beta$ 1 produit de façon endogène est capable de moduler l'expression du HIF-1 $\alpha$ . Pour ce faire, la production de TGF $\beta$ 1 mature a été bloquée chez les cellules HT-1080 par un traitement au DEC-R-V-K-R-CH<sub>2</sub>Cl ou par l'expression d' $\alpha$ 1-PDX, deux inhibiteurs de la furine. La neutralisation de l'activité de la furine a causé une inhibition marquée des niveaux d'expression basale de

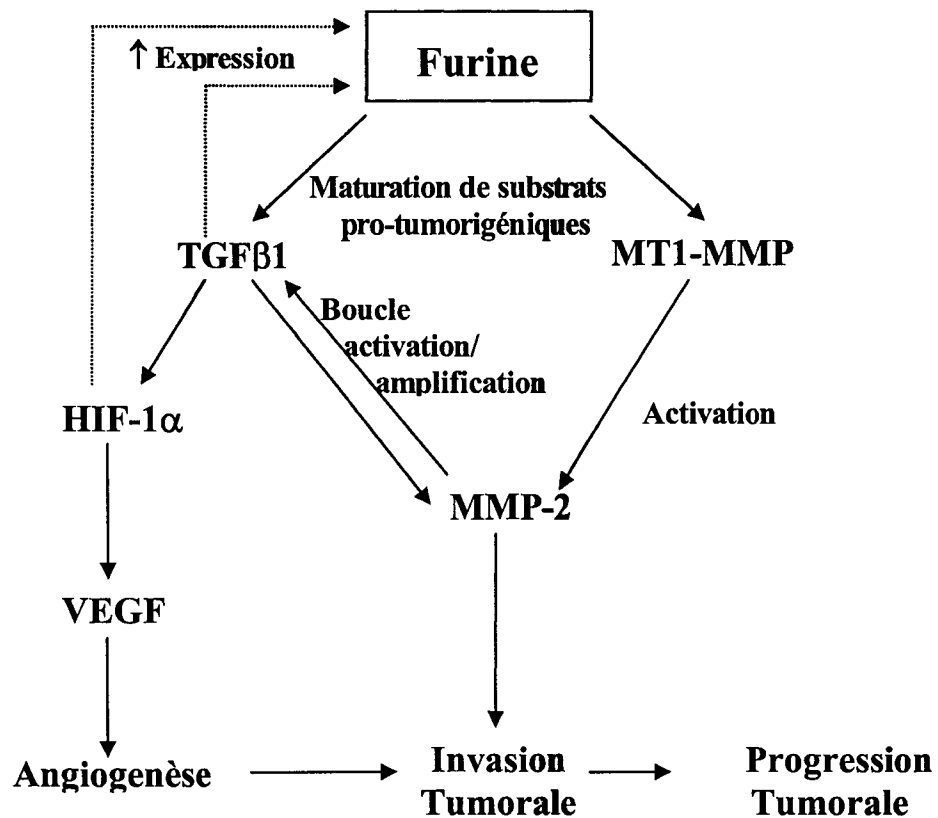
l'ARNm et de la protéine encodant le HIF-1 $\alpha$ . Cette inhibition, efficacement renversée par une stimulation au TGF $\beta$ 1 exogène, s'est également traduite par une diminution de l'expression de VEGF, une cible clé du HIF-1. La production de VEGF en réponse au TGF $\beta$ 1 est bien documentée et l'implication des facteurs de transcription AP-1 et HIF-1 dans ce processus a été proposée (Saito et al., 1999; Shih and Claffey, 2001). Nous avons donc utilisé deux modèles cellulaires déficients en HIF-1 fonctionnel afin de démontrer la contribution exacte du HIF-1 dans la production de VEGF induite par le TGF $\beta$ 1. Les résultats obtenus indiquent que le HIF-1 contribue significativement (40 à 50%) à cette réponse (figures 6A et B du chapitre III). Il a été rapporté précédemment que plusieurs lignées cellulaires tumorales expriment le HIF-1 $\alpha$ , même lorsqu'elles sont cultivées en normoxie (Blancher et al., 2000; Vleugel et al., 2005; Zhong et al., 1998). Puisqu'un grand nombre de ces cellules tumorales produisent également de grandes quantités de TGF $\beta$ 1 (Coombes et al., 1990; Hasegawa et al., 2001), il serait justifié d'examiner si les niveaux d'expression du HIF-1 $\alpha$  corréleraient avec ceux du TGF $\beta$ 1. L'existence d'une corrélation entre la production de VEGF et l'expression du HIF-1 $\alpha$  et du TGF $\beta$ 1 pourrait également être vérifiée. Ceci nous fournirait des informations concernant les impacts biologiques de la régulation du HIF-1 par le TGF $\beta$ 1.

Les travaux présentés aux chapitres I, II et III contribuent, de façon globale, à la compréhension des rôles de la furine dans la tumorigénèse et des mécanismes contrôlant l'expression de cette convertase dans la condition pathologique du cancer. Dans un premier temps, les résultats présentés aux chapitres I et III révèlent de nouvelles voies d'action de la furine dans le processus de progression tumorale via la maturation du

facteur de croissance TGF $\beta$ 1. Tel que présenté au chapitre I, la production de TGF $\beta$ 1 bioactif par la furine induit la production de la MMP-2, une protéase associée au processus d'invasion tumorale. Cette métalloprotéinase participe à l'activation du TGF $\beta$ 1 chez les cellules tumorales LoVo, ce qui crée une boucle d'activation/amplification entre la MMP-2 et le TGF $\beta$ 1 et entraîne une augmentation de la capacité invasive. Les travaux du chapitre III suggèrent un second rôle pour le TGF $\beta$ 1 dans la progression tumorale, via l'induction de l'expression du HIF-1, ce qui induit l'expression de gènes pro-tumorigéniques tels que le facteur de croissance VEGF (figure 16). Ces travaux s'associent aux efforts récemment déployés par plusieurs équipes de recherche afin de mettre en lumière les mécanismes et les substrats impliqués dans les effets prolifératif, invasif, pro-angiogénique et pro-tumorigénique de la furine. Ils contribuent également à la compréhension des fonctions pro-tumorigéniques du TGF $\beta$ 1.

Dans un second ordre d'idée, les résultats du chapitre II démontrent que l'hypoxie, un régulateur clé de la tumorigenèse, induit l'expression de la furine via le facteur de transcription HIF-1. Cette induction engendre une augmentation de l'activation/maturation de facteurs pro-tumorigéniques tels que les substrats de la furine MT1-MMP et TGF $\beta$ 1. De façon intéressante, l'expression du HIF-1 $\alpha$  qui est gouvernée

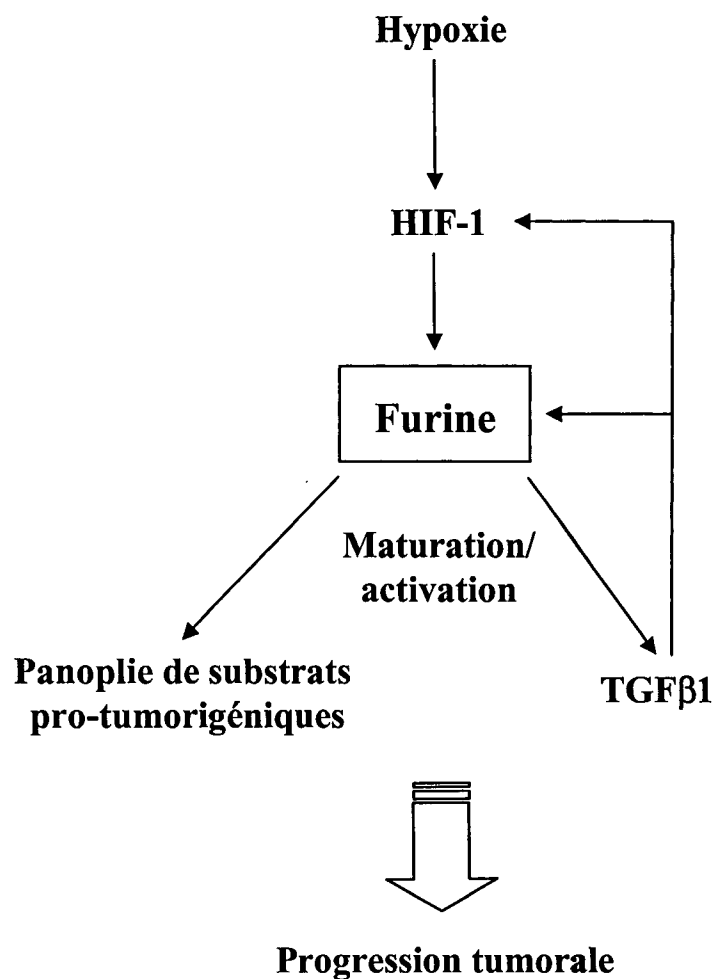




**Figure 16 : Résumé des rôles de la furine dans la tumorigénèse selon les travaux réalisés aux chapitres I, II et III de cette thèse.** La production de TGFβ1 bioactif par la furine induit l'accumulation du facteur de transcription HIF-1, ce qui occasionne une augmentation de la production de VEGF, un facteur pro-angiogénique. Le TGFβ1 induit également l'expression de la MMP-2, une protéase associée à l'invasion tumorale. Cette MMP est activée par la MT1-MMP, dont l'activation est dépendante de la furine dans certains types cellulaires. La MMP-2 active participe à l'activation du TGFβ1, ce qui crée une boucle d'activation/amplification. Le TGFβ1 et le HIF-1 peuvent également induire l'expression de la furine, ce qui peut contribuer à la disponibilité de substrats pro-tumorigéniques matures/actifs.

par l'hypoxie, peut également être régie par le TGF $\beta$ 1 (chapitre III), ce qui laisse présager que ce facteur de croissance peut induire l'expression de sa propre convertase, la furine, via le HIF-1, créant ainsi une boucle d'activation/régulation (figure 17).

Il a été démontré précédemment au laboratoire que le TGF $\beta$ 1 induit l'expression de sa propre convertase, la furine, via l'activation de la voie des Smad (Blanchette et al., 2001b). Ces études indiquent que le promoteur P1-*fur* est aussi celui qui est le plus sensible et qui répond le plus fortement au TGF $\beta$ 1. La nature précise des éléments « en cis » nécessaires à cette induction n'a toutefois pas été déterminée. L'étude de constructions de délétion en 5' du promoteur P1 a cependant permis de délimiter la région nécessaire à la réponse au TGF $\beta$ 1, soit la région qui s'étend de -1221 à -413 (voir figure 3A du chapitre II). Celle-ci coïncide avec la région nécessaire à la régulation du promoteur P1 par le HIF-1. Ainsi, des questions se posent quant aux mécanismes employés par le TGF $\beta$ 1 pour induire l'expression de la furine. Différentes hypothèses peuvent être proposées. D'abord, il est possible que le rôle inducteur du TGF $\beta$ 1 soit transmis par la liaison directe de Smad à des sites de liaison putatifs répertoriés dans cette région du promoteur P1. Une seconde possibilité est que l'effet du TGF $\beta$ 1 soit transmis via le HIF-1, pour lequel nous avons démontré une interaction directe avec le promoteur P1 de la furine. Des essais préliminaires réalisés au laboratoire tendent à démontrer que la mutation du site HRE-H5 (voir figure 3A du chapitre II), qui est responsable de la liaison du facteur de transcription HIF-1 au promoteur P1, inhibe partiellement l'activité du promoteur en réponse au TGF $\beta$ 1. Ces observations suggèrent donc qu'une partie des effets du TGF $\beta$ 1 sur l'expression de la furine serait attribuable à sa capacité à induire



**Figure 17 : Représentation schématique des mécanismes de régulation de la furine dans le contexte tumoral.** Les résultats présentés au chapitre II de cette thèse indiquent que l'hypoxie, via le facteur de transcription HIF-1, induit l'expression de la furine. Cette induction engendre une augmentation de la production de TGFβ1 bioactif. La furine est également responsable de la maturation d'une panoplie de facteurs impliqués dans la progression tumorale. Au chapitre III, nous avons démontré que le TGFβ1 bioactif peut induire l'accumulation du HIF-1, ce qui peut potentiellement avoir un impact sur l'expression de la furine. Il a également été démontré précédemment au laboratoire que le TGFβ1 induit l'expression de la furine via la voie des Smad.

l'expression du HIF-1. De façon intéressante, il a été démontré que les Smad et le HIF-1 peuvent agir de concert afin d'induire l'expression des gènes de l'érythropoïétine, de l'endogline et du VEGF (Sanchez-Elsner et al., 2001; Sanchez-Elsner et al., 2002; Sanchez-Elsner et al., 2004). Plus particulièrement, une interaction directe entre le Smad3 et le HIF-1 a été mise en évidence par des expériences de co-immunoprécipitation (Sanchez-Elsner et al., 2004). L'effet additif de cette coopération sur l'expression de ces gènes est transmis par la liaison à l'ADN de chacun de ces facteurs de transcription à des sites consensus respectifs et adjacents. La présence de sites de liaison pour les Smad a été répertoriée dans la région environnant la séquence HRE-H5 nécessaire à l'activation du promoteur P1 par le HIF-1. Une collaboration entre les Smad et le HIF-1 peut donc être envisagée en ce qui a trait à l'expression de la furine en réponse au TGF $\beta$ 1.

Bien que le HIF-1 augmente significativement l'expression de la furine dans un modèle d'étude *in vitro*, la capacité de ce facteur de transcription à induire l'expression intratumorale de la furine reste à définir. Les résultats préliminaires obtenus par Sébastien Grandmont, un étudiant à la maîtrise au laboratoire, indiquent une augmentation de l'expression de la furine dans les zones hypoxiques de tumeurs formées suite à l'injection de cellules HT-1080 chez des souris nues. Afin de démontrer si le HIF-1 participe à cette induction de l'expression de la furine au sein de tumeurs solides, nous pourrions utiliser des constructions plasmidiques comprenant le gène de la protéine fluorescente verte (GFP) sous le contrôle du promoteur P1 de type sauvage ou muté au site HRE-H5 de façon à abolir la liaison du HIF-1. Des cellules tumorales surexprimant chacune de ces constructions pourraient ensuite être injectées chez des souris immunodéficientes afin de

produire des tumeurs. L'analyse par microscopie à fluorescence de l'intensité d'expression de la GFP chez ces tumeurs permettrait de définir si le HIF-1 contribue à l'activité du promoteur P1 de la furine en conditions tumorales.

Il est connu que l'expression du HIF-1 $\alpha$  à l'intérieur de tumeurs solides ne corrèle pas forcément avec les régions hypoxiques (Janssen et al., 2002; Vukovic et al., 2001). À la lumière de nos résultats, il est tentant de supposer que le TGF $\beta$ 1, qui est surexprimé chez plusieurs types de cancers, contribue au patron homogène d'expression intra-tumorale du HIF-1 $\alpha$  (Coombes et al., 1990; Hasegawa et al., 2001). À l'aide de marqueurs de type pyronidazole, qui se lient spécifiquement aux cellules hypoxiques, nous pourrions examiner si le HIF-1 $\alpha$ , en plus de colocaliser avec les régions hypoxiques de la tumeur, est exprimé de façon coordonnée avec le TGF $\beta$ 1. Ces études nous renseigneraient sur la possibilité que le TGF $\beta$ 1 puisse contrôler de façon intratumorale l'expression du HIF-1.

Par ailleurs, en plus du TGF $\beta$ 1, les tumeurs expriment d'autres molécules qui induisent l'expression du HIF-1 $\alpha$ . Parmi ceux-ci, on retrouve des substrats de la furine tels que l'IGF-1, le HGF et le PDGF (Fukuda et al., 2002; Richard et al., 2000; Tacchini et al., 2001; Takahashi et al., 1993). Il est donc possible que ces facteurs de croissance participent, via l'induction du HIF-1, à l'augmentation des niveaux de la furine observée chez différents types de cancer. Des cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , qui est libéré des membranes cellulaires par un substrat de la furine, soit la TACE (Srour et al., 2003), induisent également l'activité du HIF-1 en normoxie (Hellwig-Burgel et al., 1999; Zhou et al., 2003). La présence de zones hypoxiques est une caractéristique associée à

divers processus physiologiques, incluant l'embryogenèse, et pathologiques, tels que la polyarthrite rhumatoïde (Covello and Simon, 2004; Distler et al., 2004). Ces observations suggèrent donc que la régulation de la furine par le HIF-1 peut être un phénomène applicable à d'autres contextes cellulaires, particulièrement en conditions inflammatoires où il a été démontré que l'activité de cette convertase est modulée à la hausse (Blanchette et al., 1997).

## **CONCLUSION :**

Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour but d'élucider les mécanismes d'action empruntés par la furine afin de favoriser la progression tumorale ainsi que les voies impliquées dans la régulation de l'expression de cette convertase dans la condition pathologique du cancer. Nous avons d'abord établi l'existence d'une nouvelle voie d'action de la furine dans le processus d'invasion via la production endogène de TGF $\beta$ 1 bioactif. Ce mécanisme implique une boucle d'activation/amplification entre la MMP-2 et le TGF $\beta$ 1 qui engendre une augmentation de la capacité invasive de cellules tumorales. Par la suite, nous avons démontré comment l'hypoxie, via le facteur de transcription HIF-1, induit l'expression de la furine. Ces travaux, en plus de contribuer à la compréhension des mécanismes menant à la surexpression de la furine dans les tumeurs, révèlent une nouvelle facette des conséquences physiologiques de l'hypoxie via l'induction de la maturation/activation par la furine de proprotéines impliquées dans la tumorigenèse. Nous avons poursuivi nos travaux en étudiant les mécanismes par lesquels le substrat de la furine, le TGF $\beta$ 1, induit l'accumulation du HIF-1 en conditions normoxiques. Nos résultats révèlent un mécanisme, jusqu'à lors inédit en ce qui concerne l'accumulation du HIF-1 $\alpha$  en réponse à des stimuli non-hypoxiques. Ce dernier consiste en une inhibition de l'expression de la PHD2 qui se traduit par l'atténuation de l'hydroxylation du HIF-1 $\alpha$  et l'induction de sa stabilité.

Ensemble, ses connaissances s'associent aux efforts récemment déployés par la communauté scientifique afin de comprendre les différents déterminants qui prennent part

au processus extrêmement complexe de la tumorigenèse. Nos travaux supportent l'hypothèse voulant que la maturation/activation de proprotéines contribue significativement au développement tumoral et que les effets potentiellement néfastes de la furine sur le maintien de l'homéostasie cellulaire en conditions physiologiques sont évités par de faibles niveaux d'expression cellulaire. La recherche portant sur les convertases de proprotéines prend donc un virage très intéressant et très pertinent puisque l'on considère l'inhibition de l'activité et/ou de l'expression de la furine en tant que cibles thérapeutiques potentielles dans le contrôle de la progression tumorale (Khatib et al., 2002).



## **REMERCIEMENTS :**

J'aimerais d'abord exprimer ma gratitude à ma directrice de thèse, Dre Claire M. Dubois, pour la confiance et liberté d'action qu'elle m'a accordé au cours des années passées dans son laboratoire. Ce fut un plaisir de travailler sous sa direction dans un domaine aussi intéressant que celui des convertases de proprotéines. Je tiens à remercier Dre Dubois pour son temps, sa patience, sa rigueur scientifique ainsi que son énergie qui ont contribué à ma formation scientifique.

Je désire remercier les membres du jury, soit les Drs Jana Stankova, Claire M. Dubois, Nathalie Rivard ainsi que Majambu Mbikay, d'avoir accepté d'accorder de leur temps à la lecture et l'évaluation de ma thèse.

J'aimerais également exprimer toute ma reconnaissance à Francine Grondin pour son support technique et moral, sa bonne humeur, ses encouragements et son aide. Je remercie les étudiants (passés et présents) du laboratoire de Dre Dubois, François Blanchette, Marie-Hélène Laprise, David Bouchard, Marie-Claude Riendeau, Annie LeBel, Philippe Guimont, Martine Charbonneau et Sébastien Grandmont pour leur aide et d'avoir fait de mon passage au laboratoire un moment agréable et mémorable. J'ai apprécié les échanges scientifiques mais aussi les moments de « dérives intellectuelles » passés en votre compagnie. Je remercie également les stagiaires, dont j'ai eu l'occasion de participer à leur formation, pour leur aide ainsi que d'avoir égayé le laboratoire de leur présence.

Je désire remercier tous les étudiants, les professeurs, les secrétaires ainsi que le personnel technique du programme d'Immunologie avec qui ce fut un plaisir de travailler, discuter et s'amuser. Un merci particulier à Dr Dupuis dont les conversations en fin de journée ont contribué à étoffer ma « culture scientifique » et ma passion pour les sciences.

Je tiens à remercier ma famille (mon père André, mon frère Pascal, Naomi et Mathilde) pour leurs encouragements, leur support et le bonheur qu'elle m'apporte. Je désire remercier ma mère de tout mon cœur. Elle a été un exemple de courage, de ténacité et de détermination. Malgré son absence, elle m'accompagne dans tous mes accomplissements. Un merci particulier à Boris pour sa patience infinie. Son support, sa compréhension, sa foi dans mes capacités et son optimisme ont été des atouts précieux pour la réalisation de mes études.

Mes amis méritent des remerciements spéciaux pour le soleil qu'ils apportent dans ma vie (Geneviève, Sylvie, Marc, Annie, Nathalie G...). Je vous apprécie tous pour votre support et vos encouragements mais surtout pour les bons moments passés en votre compagnie.

Je remercie le Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) qui m'a attribué des bourses pour la réalisation de mes études graduées, ainsi que les Instituts de Recherches en Santé du Canada (IRSC) dont la contribution financière a permis la réalisation de mes projets de recherche.

## **BIBLIOGRAPHIE :**

- Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J.P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derre, A., Villeger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J.M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N.G. and Boileau, C. (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, **34**, 154-156.
- Aebbersold, D.M., Burri, P., Beer, K.T., Laissue, J., Djonov, V., Greiner, R.H. and Semenza, G.L. (2001) Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res*, **61**, 2911-2916.
- Almholt, K. and Johnsen, M. (2003) Stromal cell involvement in cancer. *Recent Results Cancer Res*, **162**, 31-42.
- Anderson, E.D., Molloy, S.S., Jean, F., Fei, H., Shimamura, S. and Thomas, G. (2002) The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J Biol Chem*, **277**, 12879-12890.
- Anderson, E.D., Thomas, L., Hayflick, J.S. and Thomas, G. (1993) Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J Biol Chem*, **268**, 24887-24891.
- Anderson, E.D., VanSlyke, J.K., Thulin, C.D., Jean, F. and Thomas, G. (1997) Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *Embo J*, **16**, 1508-1518.
- Anglikar, H. (1995) Synthesis of tight binding inhibitors and their action on the proprotein-processing enzyme furin. *J Med Chem*, **38**, 4014-4018.
- Aprelikova, O., Chandramouli, G.V., Wood, M., Vasselli, J.R., Riss, J., Maranchie, J.K., Linehan, W.M. and Barrett, J.C. (2004) Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem*, **92**, 491-501.
- Ashcroft, G.S. (1999) Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes Infect*, **1**, 1275-1282.
- Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M. and Sporn, M.B. (1983) Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem*, **258**, 7155-7160.
- Atkinson, S.J., Crabbe, T., Cowell, S., Ward, R.V., Butler, M.J., Sato, H., Seiki, M., Reynolds, J.J. and Murphy, G. (1995) Intermolecular autolytic cleavage can contribute to the activation of progelatinase A by cell membranes. *J Biol Chem*, **270**, 30479-30485.
- Ayoubi, T.A., Creemers, J.W., Roebroek, A.J. and Van de Ven, W.J. (1994) Expression of the dibasic proprotein processing enzyme furin is directed by multiple promoters. *J Biol Chem*, **269**, 9298-9303.
- Bachman, K.E. and Park, B.H. (2005) Dual nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter. *Curr Opin Oncol*, **17**, 49-54.
- Baker, A.H., Edwards, D.R. and Murphy, G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, **115**, 3719-3727.
- Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L. and Arteaga, C.L. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor

- beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem*, **275**, 36803-36810.
- Bando, M., Matsuoka, A., Tsuji, A. and Matsuda, Y. (2002) The proprotein convertase PACE4 is upregulated by PDGF-BB in megakaryocytes: gene expression of PACE4 and furin is regulated differently in Dami cells. *J Biochem (Tokyo)*, **132**, 127-134.
- Bangoura, G., Yang, L.Y., Huang, G.W. and Wang, W. (2004) Expression of HIF-2alpha/EPAS1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, **10**, 525-530.
- Basak, A., Schmidt, C., Ismail, A.A., Seidah, N.G., Chretien, M. and Lazure, C. (1995) Peptidyl substrates containing unnatural amino acid at the P'1 position are potent inhibitors of prohormone convertases. *Int J Pept Protein Res*, **46**, 228-237.
- Baserga, R., Peruzzi, F. and Reiss, K. (2003) The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer*, **107**, 873-877.
- Basset, P., Bellocq, J.P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J.M., Podhajcer, O.L., Chenard, M.P., Rio, M.C. and Chambon, P. (1990) A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*, **348**, 699-704.
- Bassi, D.E., Lopez De Cicco, R., Mahloogi, H., Zucker, S., Thomas, G. and Klein-Szanto, A.J. (2001a) Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10326-10331.
- Bassi, D.E., Mahloogi, H., Al-Saleem, L., Lopez De Cicco, R., Ridge, J.A. and Klein-Szanto, A.J. (2001b) Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol Carcinog*, **31**, 224-232.
- Bassi, D.E., Mahloogi, H. and Klein-Szanto, A.J. (2000) The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Mol Carcinog*, **28**, 63-69.
- Bassi, D.E., Mahloogi, H., Lopez De Cicco, R. and Klein-Szanto, A. (2003) Increased furin activity enhances the malignant phenotype of human head and neck cancer cells. *Am J Pathol*, **162**, 439-447.
- Bathurst, I.C., Brennan, S.O., Carrell, R.W., Cousens, L.S., Brake, A.J. and Barr, P.J. (1987) Yeast KEX2 protease has the properties of a human proalbumin converting enzyme. *Science*, **235**, 348-350.
- Beasley, N.J., Leek, R., Alam, M., Turley, H., Cox, G.J., Gatter, K., Millard, P., Fuggle, S. and Harris, A.L. (2002) Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res*, **62**, 2493-2497.
- Beaubien, G., Schafer, M.K., Weihe, E., Dong, W., Chretien, M., Seidah, N.G. and Day, R. (1995) The distinct gene expression of the pro-hormone convertases in the rat heart suggests potential substrates. *Cell Tissue Res*, **279**, 539-549.
- Beauregard, K.E., Collier, R.J. and Swanson, J.A. (2000) Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalization. *Cell Microbiol*, **2**, 251-258.
- Beckner, M.E. (1999) Factors promoting tumor angiogenesis. *Cancer Invest*, **17**, 594-623.
- Benckert, C., Jonas, S., Cramer, T., Von Marschall, Z., Schafer, G., Peters, M., Wagner, K., Radke, C., Wiedenmann, B., Neuhaus, P., Hocker, M. and Rosewicz, S. (2003) Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor

- gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, **63**, 1083-1092.
- Benjannet, S., Elagoz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J.S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J.A., Sisodia, S., Checler, F., Chretien, M. and Seidah, N.G. (2001) Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem*, **276**, 10879-10887.
- Benjannet, S., Rondeau, N., Day, R., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1991) PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3564-3568.
- Benjannet, S., Savaria, D., Laslop, A., Munzer, J.S., Chretien, M., Marcinkiewicz, M. and Seidah, N.G. (1997) Alpha1-antitrypsin Portland inhibits processing of precursors mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem*, **272**, 26210-26218.
- Bernatchez, P.N., Rollin, S., Soker, S. and Sirois, M.G. (2002) Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1. *J Cell Biochem*, **85**, 629-639.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D. and Pouyssegur, J. (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Embo J*, **22**, 4082-4090.
- Blancher, C., Moore, J.W., Talks, K.L., Houlbrook, S. and Harris, A.L. (2000) Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*, **60**, 7106-7113.
- Blanchette, F., Day, R., Dong, W., Laprise, M.H. and Dubois, C.M. (1997) TGFbeta1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. *J Clin Invest*, **99**, 1974-1983.
- Blanchette, F., Rivard, N., Rudd, P., Grondin, F., Attisano, L. and Dubois, C.M. (2001a) Cross-talk between the p42/p44 MAP kinase and Smad pathways in transforming growth factor beta 1-induced furin gene transactivation. *J Biol Chem*, **276**, 33986-33994.
- Blanchette, F., Rudd, P., Grondin, F., Attisano, L. and Dubois, C.M. (2001b) Involvement of Smads in TGFbeta1-induced furin (fur) transcription. *J Cell Physiol*, **188**, 264-273.
- Blavier, L. and DeClerck, Y.A. (1997) Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is expressed in the interstitial matrix in adult mouse organs and during embryonic development. *Mol Biol Cell*, **8**, 1513-1527.
- Blouin, C.C., Page, E.L., Soucy, G.M. and Richard, D.E. (2004) Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood*, **103**, 1124-1130.
- Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C.F., Mommers, E.C., Semenza, G.L., Pinedo, H.M., Abeloff, M.D., Simons, J.W., van Diest, P.J. and van der Wall, E. (2001) Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 309-314.
- Bosshart, H., Humphrey, J., Deignan, E., Davidson, J., Drazba, J., Yuan, L., Oorschot, V., Peters, P.J. and Bonifacino, J.S. (1994) The cytoplasmic domain mediates

- localization of furin to the trans-Golgi network en route to the endosomal/lysosomal system. *J Cell Biol*, **126**, 1157-1172.
- Boudreault, A., Gauthier, D. and Lazure, C. (1998) Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and Hfurin. *J Biol Chem*, **273**, 31574-31580.
- Breier, G., Blum, S., Peli, J., Groot, M., Wild, C., Risau, W. and Reichmann, E. (2002) Transforming growth factor-beta and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis. *Int J Cancer*, **97**, 142-148.
- Brown, P.D., Levy, A.T., Margulies, I.M., Liotta, L.A. and Stetler-Stevenson, W.G. (1990) Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Res*, **50**, 6184-6191.
- Bruick, R.K. and McKnight, S.L. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, **294**, 1337-1340.
- Brunori, M., Luciano, P., Gilson, E. and Geli, V. (2005) The telomerase cycle: normal and pathological aspects. *J Mol Med*, **83**, 244-257.
- Bruzzaniti, A., Goodge, K., Jay, P., Taviaux, S.A., Lam, M.H., Berta, P., Martin, T.J., Moseley, J.M. and Gillespie, M.T. (1996) PC8 [corrected], a new member of the convertase family. *Biochem J*, **314** ( Pt 3), 727-731.
- Bryan, P., Pantoliano, M.W., Quill, S.G., Hsiao, H.Y. and Poulos, T. (1986) Site-directed mutagenesis and the role of the oxyanion hole in subtilisin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3743-3745.
- Bryan, T.M. and Cech, T.R. (1999) Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 318-324.
- Cameron, A., Appel, J., Houghten, R.A. and Lindberg, I. (2000a) Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem*, **275**, 36741-36749.
- Cameron, A., Fortenberry, Y. and Lindberg, I. (2000b) The SAAS granin exhibits structural and functional homology to 7B2 and contains a highly potent hexapeptide inhibitor of PC1. *FEBS Lett*, **473**, 135-138.
- Campan, M., Yoshizumi, M., Seidah, N.G., Lee, M.E., Bianchi, C. and Haber, E. (1996) Increased proteolytic processing of protein tyrosine phosphatase mu in confluent vascular endothelial cells: the role of PC5, a member of the subtilisin family. *Biochemistry*, **35**, 3797-3802.
- Cao, J., Drews, M., Lee, H.M., Conner, C., Bahou, W.F. and Zucker, S. (1998) The propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is required for binding of tissue inhibitor of metalloproteinases and for activation of progelatinase A. *J Biol Chem*, **273**, 34745-34752.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D. and Keshert, E. (1998) Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, **394**, 485-490.
- Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H. and Poellinger, L. (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*, **20**, 402-415.

- Carrozza, M.J., Utley, R.T., Workman, J.L. and Cote, J. (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet*, **19**, 321-329.
- Celentano, D.C. and Frishman, W.H. (1997) Matrix metalloproteinases and coronary artery disease: a novel therapeutic target. *J Clin Pharmacol*, **37**, 991-1000.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A. and Chakraborti, T. (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*, **253**, 269-285.
- Chan, D.A., Sutphin, P.D., Denko, N.C. and Giaccia, A.J. (2002) Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J Biol Chem*, **277**, 40112-40117.
- Chang, H.C., Liu, L.T. and Hung, W.C. (2004) Involvement of histone deacetylation in ras-induced down-regulation of the metastasis suppressor RECK. *Cell Signal*, **16**, 675-679.
- Chapman, J.D. (1984) The detection and measurement of hypoxic cells in solid tumors. *Cancer*, **54**, 2441-2449.
- Chapman, R.E. and Munro, S. (1994) Retrieval of TGN proteins from the cell surface requires endosomal acidification. *Embo J*, **13**, 2305-2312.
- Chattopadhyay, N., Mitra, A., Frei, E. and Chatterjee, A. (2001) Human cervical tumor cell (SiHa) surface  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin receptor has associated matrix metalloproteinase (MMP-2) activity. *J Cancer Res Clin Oncol*, **127**, 653-658.
- Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F. and Maity, A. (2001a) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem*, **276**, 9519-9525.
- Chen, J., Halappanavar, S.S., St-Germain, J.R., Tsang, B.K. and Li, Q. (2004) Role of Akt/protein kinase B in the activity of transcriptional coactivator p300. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 1675-1683.
- Chen, R.H., Su, Y.H., Chuang, R.L. and Chang, T.Y. (1998) Suppression of transforming growth factor- $\beta$ -induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene*, **17**, 1959-1968.
- Chen, T., Yan, W., Wells, R.G., Rimm, D.L., McNiff, J., Leffell, D. and Reiss, M. (2001b) Novel inactivating mutations of transforming growth factor- $\beta$  type I receptor gene in head-and-neck cancer metastases. *Int J Cancer*, **93**, 653-661.
- Cheng, M., Watson, P.H., Paterson, J.A., Seidah, N., Chretien, M. and Shiu, R.P. (1997) Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int J Cancer*, **71**, 966-971.
- Chiu, C., Maddock, D.A., Zhang, Q., Souza, K.P., Townsend, A.R. and Wan, Y. (2001) TGF- $\beta$ -induced p38 activation is mediated by Rac1-regulated generation of reactive oxygen species in cultured human keratinocytes. *Int J Mol Med*, **8**, 251-255.
- Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, **15**, 532-534, 536-537.
- Chretien, M. and Li, C.H. (1967) Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotrophic hormone from sheep pituitary glands. *Can J Biochem*, **45**, 1163-1174.
- Chu, Y.W., Yang, P.C., Yang, S.C., Shyu, Y.C., Hendrix, M.J., Wu, R. and Wu, C.W. (1997) Selection of invasive and metastatic subpopulations from a human lung adenocarcinoma cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **17**, 353-360.

- Chua, C.C., Hamdy, R.C. and Chua, B.H. (2000) Mechanism of transforming growth factor-beta1-induced expression of vascular endothelial growth factor in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochim Biophys Acta*, **1497**, 69-76.
- Chun, T.H., Sabeh, F., Ota, I., Murphy, H., McDonagh, K.T., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Allen, E.D. and Weiss, S.J. (2004) MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *J Cell Biol*, **167**, 757-767.
- Collignon, J., Varlet, I. and Robertson, E.J. (1996) Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature*, **381**, 155-158.
- Constam, D.B. and Robertson, E.J. (2000a) SPC4/PACE4 regulates a TGFbeta signaling network during axis formation. *Genes Dev*, **14**, 1146-1155.
- Constam, D.B. and Robertson, E.J. (2000b) Tissue-specific requirements for the proprotein convertase furin/SPC1 during embryonic turning and heart looping. *Development*, **127**, 245-254.
- Coombes, R.C., Barrett-Lee, P. and Luqmani, Y. (1990) Growth factor expression in breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **37**, 833-836.
- Costa, C., Soares, R. and Schmitt, F. (2004) Angiogenesis: now and then. *Apmis*, **112**, 402-412.
- Covello, K.L. and Simon, M.C. (2004) HIFs, hypoxia, and vascular development. *Curr Top Dev Biol*, **62**, 37-54.
- Crawford, S.E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J.E., Ribeiro, S.M., Lawler, J., Hynes, R.O., Boivin, G.P. and Bouck, N. (1998) Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*, **93**, 1159-1170.
- Creemers, J.W., Ines Dominguez, D., Plets, E., Serneels, L., Taylor, N.A., Multhaupt, G., Craessaerts, K., Annaert, W. and De Strooper, B. (2001) Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J Biol Chem*, **276**, 4211-4217.
- Creemers, J.W., Siezen, R.J., Roebroek, A.J., Ayoubi, T.A., Huylebroeck, D. and Van de Ven, W.J. (1993) Modulation of furin-mediated proprotein processing activity by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **268**, 21826-21834.
- Dahlen, J.R., Foster, D.C. and Kisiel, W. (1997) Expression, Purification, and Inhibitory Properties of Human Proteinase Inhibitor 8. *Biochemistry*, **36**, 14874-14882.
- Dahlen, J.R., Jean, F., Thomas, G., Foster, D.C. and Kisiel, W. (1998) Inhibition of soluble recombinant furin by human proteinase inhibitor 8. *J Biol Chem*, **273**, 1851-1854.
- Dai, J.L., Bansal, R.K. and Kern, S.E. (1999) G1 cell cycle arrest and apoptosis induction by nuclear Smad4/Dpc4: phenotypes reversed by a tumorigenic mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1427-1432.
- Dallas, S.L., Miyazono, K., Skerry, T.M., Mundy, G.R. and Bonewald, L.F. (1995) Dual role for the latent transforming growth factor-beta binding protein in storage of latent TGF-beta in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. *J Cell Biol*, **131**, 539-549.
- Dames, S.A., Martinez-Yamout, M., De Guzman, R.N., Dyson, H.J. and Wright, P.E. (2002) Structural basis for Hif-1 alpha /CBP recognition in the cellular hypoxic response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5271-5276.



- D'Angelo, G., Duplan, E., Boyer, N., Vigne, P. and Frelin, C. (2003) Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation. *J Biol Chem*, **278**, 38183-38187.
- Datto, M.B., Li, Y., Panus, J.F., Howe, D.J., Xiong, Y. and Wang, X.F. (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5545-5549.
- Day, R., Schafer, M.K., Cullinan, W.E., Watson, S.J., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1993) Region specific expression of furin mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett*, **149**, 27-30.
- Day, R., Schafer, M.K., Watson, S.J., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1992) Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. *Mol Endocrinol*, **6**, 485-497.
- De Bie, I., Marcinkiewicz, M., Malide, D., Lazure, C., Nakayama, K., Bendayan, M. and Seidah, N.G. (1996) The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *J Cell Biol*, **135**, 1261-1275.
- Dery, M.A., Michaud, M.D. and Richard, D.E. (2005) Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 535-540.
- Derynck, R., Goeddel, D.V., Ullrich, A., Gutterman, J.U., Williams, R.D., Bringman, T.S. and Berger, W.H. (1987) Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res*, **47**, 707-712.
- Derynck, R., Jarrett, J.A., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Bell, J.R., Assoian, R.K., Roberts, A.B., Sporn, M.B. and Goeddel, D.V. (1985) Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature*, **316**, 701-705.
- Derynck, R., Lindquist, P.B., Lee, A., Wen, D., Tamm, J., Graycar, J.L., Rhee, L., Mason, A.J., Miller, D.A., Coffey, R.J. and et al. (1988) A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *Embo J*, **7**, 3737-3743.
- Derynck, R. and Zhang, Y.E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, **425**, 577-584.
- Deryugina, E.I., Luo, G.X., Reisfeld, R.A., Bourdon, M.A. and Strongin, A. (1997) Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2. *Anticancer Res*, **17**, 3201-3210.
- Deryugina, E.I., Ratnikov, B.I., Yu, Q., Baci, P.C., Rozanov, D.V. and Strongin, A.Y. (2004) Prointegrin maturation follows rapid trafficking and processing of MT1-MMP in Furin-Negative Colon Carcinoma LoVo Cells. *Traffic*, **5**, 627-641.
- Devi, L. (1991) Consensus sequence for processing of peptide precursors at monobasic sites. *FEBS Lett*, **280**, 189-194.
- Dickson, M.C., Martin, J.S., Cousins, F.M., Kulkarni, A.B., Karlsson, S. and Akhurst, R.J. (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*, **121**, 1845-1854.
- Dickson, M.C., Slager, H.G., Duffie, E., Mummery, C.L. and Akhurst, R.J. (1993) RNA and protein localisations of TGF beta 2 in the early mouse embryo suggest an involvement in cardiac development. *Development*, **117**, 625-639.

- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, **11**, 1475-1489.
- Distler, J.H., Wenger, R.H., Gassmann, M., Kurowska, M., Hirth, A., Gay, S. and Distler, O. (2004) Physiologic responses to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **50**, 10-23.
- Dong, W., Marcinkiewicz, M., Vieau, D., Chretien, M., Seidah, N.G. and Day, R. (1995) Distinct mRNA expression of the highly homologous convertases PC5 and PACE4 in the rat brain and pituitary. *J Neurosci*, **15**, 1778-1796.
- Dong, W., Seidel, B., Marcinkiewicz, M., Chretien, M., Seidah, N.G. and Day, R. (1997) Cellular localization of the prohormone convertases in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei: selective regulation of PC1 in corticotrophin-releasing hormone parvocellular neurons mediated by glucocorticoids. *J Neurosci*, **17**, 563-575.
- Donovan, D., Harmey, J.H., Toomey, D., Osborne, D.H., Redmond, H.P. and Bouchier-Hayes, D.J. (1997) TGF beta-1 regulation of VEGF production by breast cancer cells. *Ann Surg Oncol*, **4**, 621-627.
- Dubois, C.M., Blanchette, F., Laprise, M.H., Leduc, R., Grondin, F. and Seidah, N.G. (2001) Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol*, **158**, 305-316.
- Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E. and Leduc, R. (1995) Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem*, **270**, 10618-10624.
- Duguay, S.J., Jin, Y., Stein, J., Duguay, A.N., Gardner, P. and Steiner, D.F. (1998) Post-translational processing of the insulin-like growth factor-2 precursor. Analysis of O-glycosylation and endoproteolysis. *J Biol Chem*, **273**, 18443-18451.
- Duguay, S.J., Lai-Zhang, J. and Steiner, D.F. (1995) Mutational analysis of the insulin-like growth factor I prohormone processing site. *J Biol Chem*, **270**, 17566-17574.
- Duguay, S.J., Milewski, W.M., Young, B.D., Nakayama, K. and Steiner, D.F. (1997) Processing of wild-type and mutant proinsulin-like growth factor-IA by subtilisin-related proprotein convertases. *J Biol Chem*, **272**, 6663-6670.
- Duivenvoorden, W.C., Hirte, H.W. and Singh, G. (1999) Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, **17**, 27-34.
- Dupuy, A., Lindberg, I., Zhou, Y., Akil, H., Lazure, C., Chretien, M., Seidah, N.G. and Day, R. (1994) Processing of prodynorphin by the prohormone convertase PC1 results in high molecular weight intermediate forms. Cleavage at a single arginine residue. *FEBS Lett*, **337**, 60-65.
- Ebert, B.L., Firth, J.D. and Ratcliffe, P.J. (1995) Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem*, **270**, 29083-29089.
- Edwards, D.R. and Murphy, G. (1998) Cancer. Proteases--invasion and more. *Nature*, **394**, 527-528.
- Egeblad, M. and Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 161-174.

- Eisma, R.J., Spiro, J.D., von Biberstein, S.E., Lindquist, R. and Kreutzer, D.L. (1996) Decreased expression of transforming growth factor beta receptors on head and neck squamous cell carcinoma tumor cells. *Am J Surg*, **172**, 641-645.
- Elagoz, A., Benjannet, S., Mammabassi, A., Wickham, L. and Seidah, N.G. (2002) Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/S1P: ectodomain shedding requires SKI-1 activity. *J Biol Chem*, **277**, 11265-11275.
- Ellenrieder, V., Hendler, S.F., Ruhland, C., Boeck, W., Adler, G. and Gress, T.M. (2001) TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. *Int J Cancer*, **93**, 204-211.
- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J. and Ratcliffe, P.J. (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, **107**, 43-54.
- Erez, N., Stambolsky, P., Shats, I., Milyavsky, M., Kachko, T. and Rotter, V. (2004) Hypoxia-dependent regulation of PHD1: cloning and characterization of the human PHD1/EGLN2 gene promoter. *FEBS Lett*, **567**, 311-315.
- Erslev, A.J. (1964) The Role of Erythropoietin in the Control of Red Cell Production. *Medicine (Baltimore)*, **43**, 661-665.
- Faller, D.V. (1999) Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **26**, 74-84.
- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G. and Semenza, G.L. (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*, **59**, 3915-3918.
- Ferrara, N. (2005) The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *Exs*, 209-231.
- Firth, J.D., Ebert, B.L. and Ratcliffe, P.J. (1995) Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem*, **270**, 21021-21027.
- Flenniken, A.M. and Williams, B.R. (1990) Developmental expression of the endogenous TIMP gene and a TIMP-lacZ fusion gene in transgenic mice. *Genes Dev*, **4**, 1094-1106.
- Forbes, K., Gillette, K., Kelley, L.A. and Sehgal, I. (2004) Increased levels of urokinase plasminogen activator receptor in prostate cancer cells derived from repeated metastasis. *World J Urol*, **22**, 67-71.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D. and Semenza, G.L. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, **16**, 4604-4613.
- Fortunel, N.O., Hatzfeld, A. and Hatzfeld, J.A. (2000) Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*, **96**, 2022-2036.
- Franchi, A., Gallo, O., Sardi, I. and Santucci, M. (2001) Downregulation of transforming growth factor beta type II receptor in laryngeal carcinogenesis. *J Clin Pathol*, **54**, 201-204.

- Freedman, S.J., Sun, Z.Y., Poy, F., Kung, A.L., Livingston, D.M., Wagner, G. and Eck, M.J. (2002) Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5367-5372.
- Fricker, L.D., McKinzie, A.A., Sun, J., Curran, E., Qian, Y., Yan, L., Patterson, S.D., Courchesne, P.L., Richards, B., Levin, N., Mzhavia, N., Devi, L.A. and Douglass, J. (2000) Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *J Neurosci*, **20**, 639-648.
- Friedrich, C.A. (2001) Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau syndrome. *Hum Mol Genet*, **10**, 763-767.
- Fu, X., Inouye, M. and Shinde, U. (2000) Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. The inhibitory and chaperone functions of the subtilisin propeptide are not obligatorily linked. *J Biol Chem*, **275**, 16871-16878.
- Fugere, M., Limperis, P.C., Beaulieu-Audy, V., Gagnon, F., Lavigne, P., Klarskov, K., Leduc, R. and Day, R. (2002) Inhibitory potency and specificity of subtilase-like pro-protein convertase (SPC) prodomains. *J Biol Chem*, **277**, 7648-7656.
- Fukuchi, M., Miyazaki, T., Fukai, Y., Nakajima, M., Sohda, M., Masuda, N., Manda, R., Tsukada, K., Kato, H. and Kuwano, H. (2004) Plasma level of transforming growth factor beta1 measured from the azygos vein predicts prognosis in patients with esophageal cancer. *Clin Cancer Res*, **10**, 2738-2741.
- Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y.D., Ellis, L.M. and Semenza, G.L. (2002) Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*, **277**, 38205-38211.
- Fukushima, T., Mashiko, M., Takita, K., Otake, T., Endo, Y., Sekikawa, K. and Takenoshita, S. (2003) Mutational analysis of TGF-beta type II receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6 and Smad7 genes in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, **22**, 315-320.
- Fuller, R.S., Brake, A.J. and Thorner, J. (1989) Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science*, **246**, 482-486.
- Fuller, R.S., Sterne, R.E. and Thorner, J. (1988) Enzymes required for yeast prohormone processing. *Annu Rev Physiol*, **50**, 345-362.
- Furuta, M., Yano, H., Zhou, A., Rouille, Y., Holst, J.J., Carroll, R., Ravazzola, M., Orci, L., Furuta, H. and Steiner, D.F. (1997) Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6646-6651.
- Garayoa, M., Martinez, A., Lee, S., Pio, R., An, W.G., Neckers, L., Trepel, J., Montuenga, L.M., Ryan, H., Johnson, R., Gassmann, M. and Cuttitta, F. (2000) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis. *Mol Endocrinol*, **14**, 848-862.
- Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D., Schafer, W., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E. and Klenk, H.D. (1994) Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie*, **76**, 217-225.

- Gerald, D., Berra, E., Frapart, Y.M., Chan, D.A., Giaccia, A.J., Mansuy, D., Pouyssegur, J., Yaniv, M. and Mechta-Grigoriou, F. (2004) JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*, **118**, 781-794.
- Giannelli, G., Astigiano, S., Antonaci, S., Morini, M., Barbieri, O., Noonan, D.M. and Albini, A. (2002) Role of the  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 4$  integrins in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis*, **19**, 217-223.
- Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Sivridis, E., Turley, H., Talks, K., Pezzella, F., Gatter, K.C. and Harris, A.L. (2001) Relation of hypoxia inducible factor 1  $\alpha$  and 2  $\alpha$  in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer*, **85**, 881-890.
- Gingras, A.C., Raught, B. and Sonenberg, N. (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*, **15**, 807-826.
- Gleadle, J.M., Ebert, B.L., Firth, J.D. and Ratcliffe, P.J. (1995) Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol*, **268**, C1362-1368.
- Goerges, A.L. and Nugent, M.A. (2004) pH regulates vascular endothelial growth factor binding to fibronectin: a mechanism for control of extracellular matrix storage and release. *J Biol Chem*, **279**, 2307-2315.
- Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. and Thorgeirsson, U.P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, **74**, 111-122.
- Goodge, K.A., Thomas, R.J., Martin, T.J. and Gillespie, M.T. (1998) Gene organization and alternative splicing of human prohormone convertase PC8. *Biochem J*, **336** ( Pt 2), 353-359.
- Goodman, L.J. and Gorman, C.M. (1994) Autoproteolytic activation of the mouse prohormone convertase mPC1. *Biochem Biophys Res Commun*, **201**, 795-804.
- Gordon, V.M., Klimpel, K.R., Arora, N., Henderson, M.A. and Leppla, S.H. (1995) Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases. *Infect Immun*, **63**, 82-87.
- Gorlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V.B., Berchner-Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R.P., Kietzmann, T. and Busse, R. (2001) Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res*, **89**, 47-54.
- Gory-Faure, S., Prandini, M.H., Pointu, H., Roullot, V., Pignot-Paintrand, I., Vernet, M. and Huber, P. (1999) Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development*, **126**, 2093-2102.
- Greene, J., Wang, M., Liu, Y.E., Raymond, L.A., Rosen, C. and Shi, Y.E. (1996) Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem*, **271**, 30375-30380.
- Gross, J. and Lapiere, C.M. (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **48**, 1014-1022.
- Gu, M., Gordon, V.M., Fitzgerald, D.J. and Leppla, S.H. (1996) Furin regulates both the activation of Pseudomonas exotoxin A and the Quantity of the toxin receptor expressed on target cells. *Infect Immun*, **64**, 524-527.
- Haddad, J.J. and Land, S.C. (2001) A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF- $\alpha$ -dependent regulation of HIF-1 $\alpha$ . *FEBS Lett*, **505**, 269-274.

- Hagedorn, H.G., Bachmeier, B.E. and Nerlich, A.G. (2001) Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review). *Int J Oncol*, **18**, 669-681.
- Hallenberger, S., Moulard, M., Sordel, M., Klenk, H.D. and Garten, W. (1997) The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. *J Virol*, **71**, 1036-1045.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**, 353-364.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Handsley, M.M. and Edwards, D.R. (2005) Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer*.
- Hanemaaijer, R., Verheijen, J.H., Maguire, T.M., Visser, H., Toet, K., McDermott, E., O'Higgins, N. and Duffy, M.J. (2000) Increased gelatinase-A and gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors. *Int J Cancer*, **86**, 204-207.
- Hannon, G.J. and Beach, D. (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, **371**, 257-261.
- Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y. and Imura, N. (2001) Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, **287**, 808-813.
- Hasegawa, Y., Takanashi, S., Kanehira, Y., Tsushima, T., Imai, T. and Okumura, K. (2001) Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, **91**, 964-971.
- Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Watanabe, A., Kowa, H., Hosoda, R., Nakamura, A., Kanazawa, I., Arai, T., Takio, K., Mann, D.M. and Iwatsubo, T. (2002) CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *Embo J*, **21**, 1524-1534.
- Hatsuzawa, K., Murakami, K. and Nakayama, K. (1992a) Molecular and enzymatic properties of furin, a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites. *J Biochem (Tokyo)*, **111**, 296-301.
- Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Takahashi, S., Takada, K., Murakami, K. and Nakayama, K. (1992b) Purification and characterization of furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, **267**, 16094-16099.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr., Wrana, J.L. and Falb, D. (1997) The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell*, **89**, 1165-1173.
- Hayashida, T., Decaestecker, M. and Schnaper, H.W. (2003) Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF-beta-dependent responses in human mesangial cells. *Faseb J*, **17**, 1576-1578.
- Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J. and Jelkmann, W. (1999) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*, **94**, 1561-1567.

- Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G.P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W. and Than, M.E. (2003) The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol*, **10**, 520-526.
- Herrera, B., Murillo, M.M., Alvarez-Barrientos, A., Beltran, J., Fernandez, M. and Fabregat, I. (2004) Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med*, **36**, 16-26.
- Hirohashi, S. and Kanai, Y. (2003) Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*, **94**, 575-581.
- Hirota, K., Fukuda, R., Takabuchi, S., Kizaka-Kondoh, S., Adachi, T., Fukuda, K. and Semenza, G.L. (2004) Induction of hypoxia-inducible factor 1 activity by muscarinic acetylcholine receptor signaling. *J Biol Chem*, **279**, 41521-41528.
- Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A. and Hankinson, O. (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*, **252**, 954-958.
- Hofmann, U.B., Eggert, A.A., Blass, K., Brocker, E.B. and Becker, J.C. (2003) Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res*, **63**, 8221-8225.
- Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Waas, E.T., Zendman, A.J., Cornelissen, I.M., Ruiter, D.J. and van Muijen, G.N. (1999) Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br J Cancer*, **81**, 774-782.
- Hopfl, G., Ogunshola, O. and Gassmann, M. (2004) HIFs and tumors--causes and consequences. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **286**, R608-623.
- Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W.S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K. and Nakayama, K. (1991) Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem*, **266**, 12127-12130.
- Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M. and Bunn, H.F. (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*, **271**, 32253-32259.
- Huang, L.E., Gu, J., Schau, M. and Bunn, H.F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7987-7992.
- Hubbard, F.C., Goodrow, T.L., Liu, S.C., Brilliant, M.H., Basset, P., Mains, R.E. and Klein-Szanto, A.J. (1997) Expression of PACE4 in chemically induced carcinomas is associated with spindle cell tumor conversion and increased invasive ability. *Cancer Res*, **57**, 5226-5231.
- Huggett, A.C., Hampton, L.L., Ford, C.P., Wirth, P.J. and Thorgeirsson, S.S. (1990) Altered responsiveness of rat liver epithelial cells to transforming growth factor beta 1 following their transformation with v-raf. *Cancer Res*, **50**, 7468-7475.
- Illman, S.A., Keski-Oja, J., Parks, W.C. and Lohi, J. (2003) The mouse matrix metalloproteinase, epilysin (MMP-28), is alternatively spliced and processed by a furin-like proprotein convertase. *Biochem J*, **375**, 191-197.

- Inman, G.J., Nicolas, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N.J. and Hill, C.S. (2002) SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol*, **62**, 65-74.
- Inocencio, N.M., Moehring, J.M. and Moehring, T.J. (1993) A mutant CHO-K1 strain with resistance to Pseudomonas exotoxin A is unable to process the precursor fusion glycoprotein of Newcastle disease virus. *J Virol*, **67**, 593-595.
- Inocencio, N.M., Sucic, J.F., Moehring, J.M., Spence, M.J. and Moehring, T.J. (1997) Endoprotease activities other than furin and PACE4 with a role in processing of HIV-I gp160 glycoproteins in CHO-K1 cells. *J Biol Chem*, **272**, 1344-1348.
- Ito, H., Duxbury, M., Benoit, E., Clancy, T.E., Zinner, M.J., Ashley, S.W. and Whang, E.E. (2004) Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res*, **64**, 7439-7446.
- Itoh, T., Tanioka, M., Yoshida, H., Yoshioka, T., Nishimoto, H. and Itohara, S. (1998) Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res*, **58**, 1048-1051.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. and Kaelin, W.G., Jr. (2001) HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science*, **292**, 464-468.
- Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Klausner, R.D. and Pause, A. (1999) Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12436-12441.
- Iwasaka-Yagi, C., Abe, M. and Sato, Y. (2001) TGF-beta attenuates the transactivation activity of Ets-1 despite its induction via the inhibition of DNA binding. *Tohoku J Exp Med*, **193**, 311-318.
- Iyer, N.V., Leung, S.W. and Semenza, G.L. (1998) The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics*, **52**, 159-165.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468-472.
- Janssen, H.L., Haustermans, K.M., Sprong, D., Blommesteijn, G., Hofland, I., Hoebers, F.J., Blijweert, E., Raleigh, J.A., Semenza, G.L., Varia, M.A., Balm, A.J., van Velthuysen, M.L., Delaere, P., Scot, R. and Begg, A.C. (2002) HIF-1A, pimonidazole, and iododeoxyuridine to estimate hypoxia and perfusion in human head-and-neck tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **54**, 1537-1549.
- Jean, F., Basak, A., DiMaio, J., Seidah, N.G. and Lazure, C. (1995) An internally quenched fluorogenic substrate of prohormone convertase 1 and furin leads to a potent prohormone convertase inhibitor. *Biochem J*, **307** ( Pt 3), 689-695.
- Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, A.J. and Thomas, G. (1998) alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7293-7298.



- Jean, F., Thomas, L., Molloy, S.S., Liu, G., Jarvis, M.A., Nelson, J.A. and Thomas, G. (2000) A protein-based therapeutic for human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2864-2869.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J. and Kim, K.W. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, **111**, 709-720.
- Jeong, J.W., Cha, H.J., Yu, D.Y., Seiki, M. and Kim, K.W. (1999) Induction of membrane-type matrix metalloproteinase-1 stimulates angiogenic activities of bovine aortic endothelial cells. *Angiogenesis*, **3**, 167-174.
- Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R.H. and Gassmann, M. (2001) Induction of HIF-1 $\alpha$  in response to hypoxia is instantaneous. *Faseb J*, **15**, 1312-1314.
- Jiang, B.H., Agani, F., Passaniti, A. and Semenza, G.L. (1997a) V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res*, **57**, 5328-5335.
- Jiang, B.H., Jiang, G., Zheng, J.Z., Lu, Z., Hunter, T. and Vogt, P.K. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ*, **12**, 363-369.
- Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R. and Semenza, G.L. (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **271**, 17771-17778.
- Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R. and Semenza, G.L. (1997b) Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem*, **272**, 19253-19260.
- John, A. and Tuszynski, G. (2001) The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res*, **7**, 14-23.
- Johnson, B., Brooks, B.A., Heinzmann, C., Diep, A., Mohandas, T., Sparkes, R.S., Reyes, H., Hoffman, E., Lange, E., Gatti, R.A. and et al. (1993) The Ah receptor nuclear translocator gene (ARNT) is located on q21 of human chromosome 1 and on mouse chromosome 3 near Cf-3. *Genomics*, **17**, 592-598.
- Jones, C.M., Lyons, K.M. and Hogan, B.L. (1991) Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development*, **111**, 531-542.
- Jones, J., Watt, F.M. and Speight, P.M. (1997) Changes in the expression of  $\alpha$  v integrins in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*, **26**, 63-68.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. and Thorner, J. (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- $\alpha$ -factor. *Cell*, **37**, 1075-1089.
- Jung, F., Palmer, L.A., Zhou, N. and Johns, R.A. (2000) Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ Res*, **86**, 319-325.
- Jung, Y., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., Liu, Z.G. and Neckers, L. (2003a) Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J*, **370**, 1011-1017.

- Jung, Y.J., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J. and Neckers, L. (2003b) IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *Faseb J*, **17**, 2115-2117.
- Kaelin, W.G., Jr. (2002) Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer*, **2**, 673-682.
- Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H. and Poellinger, L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Embo J*, **17**, 6573-6586.
- Kallio, P.J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J. and Poellinger, L. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5667-5672.
- Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y. and Poellinger, L. (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, **274**, 6519-6525.
- Kambhampati, S., Ray, G., Sengupta, K., Reddy, V.P., Banerjee, S.K. and Van Veldhuizen, P.J. (2005) Growth factors involved in prostate carcinogenesis. *Front Biosci*, **10**, 1355-1367.
- Kanaki, T., Bujo, H., Mori, S., Yanjuan, Z., Takahashi, K., Yokote, K., Morisaki, N. and Saito, Y. (2002) Functional analysis of aortic endothelial cells expressing mutant PDGF receptors with respect to expression of matrix metalloproteinase-3. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 231-237.
- Kanematsu, A., Marui, A., Yamamoto, S., Ozeki, M., Hirano, Y., Yamamoto, M., Ogawa, O., Komeda, M. and Tabata, Y. (2004) Type I collagen can function as a reservoir of basic fibroblast growth factor. *J Control Release*, **99**, 281-292.
- Kang, T., Nagase, H. and Pei, D. (2002) Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-Golgi network. *Cancer Res*, **62**, 675-681.
- Kanno, N., Nonomura, N., Miki, T., Kojima, Y., Takahara, S., Nozaki, M. and Okuyama, A. (1998) Effects of epidermal growth factor on the invasion activity of the bladder cancer cell line. *J Urol*, **159**, 586-590.
- Karsdal, M.A., Larsen, L., Engsig, M.T., Lou, H., Ferreras, M., Lochter, A., Delaisse, J.M. and Foged, N.T. (2002) Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 44061-44067.
- Kayo, T., Sawada, Y., Suda, M., Konda, Y., Izumi, T., Tanaka, S., Shibata, H. and Takeuchi, T. (1997) Proprotein-processing endoprotease furin controls growth of pancreatic beta-cells. *Diabetes*, **46**, 1296-1304.
- Kehrl, J.H., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., Jakowlew, S., Sporn, M.B. and Fauci, A.S. (1986a) Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol*, **137**, 3855-3860.
- Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B. and Fauci, A.S. (1986b) Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med*, **163**, 1037-1050.

- Khatib, A.M., Siegfried, G., Chretien, M., Metrakos, P. and Seidah, N.G. (2002) Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol*, **160**, 1921-1935.
- Khatib, A.M., Siegfried, G., Prat, A., Luis, J., Chretien, M., Metrakos, P. and Seidah, N.G. (2001) Inhibition of proprotein convertases is associated with loss of growth and tumorigenicity of HT-29 human colon carcinoma cells: importance of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor processing in IGF-1-mediated functions. *J Biol Chem*, **276**, 30686-30693.
- Kiefer, M.C., Tucker, J.E., Joh, R., Landsberg, K.E., Saltman, D. and Barr, P.J. (1991) Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol*, **10**, 757-769.
- Kietzmann, T., Roth, U. and Jungermann, K. (1999) Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood*, **94**, 4177-4185.
- Kim, E.S., Kim, M.S. and Moon, A. (2004) TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *Int J Oncol*, **25**, 1375-1382.
- Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashima, Y., Hashimoto, K., D'Acquisto, F., Makuuchi, M. and Esumi, H. (2001) Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem*, **276**, 2292-2298.
- Kolkenbrock, H., Hecker-Kia, A., Orgel, D., Ulbrich, N. and Will, H. (1997) Activation of progelatinase A and progelatinase A/TIMP-2 complex by membrane type 2-matrix metalloproteinase. *Biol Chem*, **378**, 71-76.
- Komada, M., Hatsuzawa, K., Shibamoto, S., Ito, F., Nakayama, K. and Kitamura, N. (1993) Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS Lett*, **328**, 25-29.
- Kotch, L.E., Iyer, N.V., Laughner, E. and Semenza, G.L. (1999) Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol*, **209**, 254-267.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Turner, B.C., Pratt, C., Howard, B., Zapata, J.M., Frenkel, V., Robertson, S., Ionov, Y., Yamamoto, H., Perucho, M., Takayama, S. and Reed, J.C. (1999) Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, **6**, 29-40.
- Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P. and Semenza, G.L. (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*, **63**, 1138-1143.
- Kumar, R., Yoneda, J., Bucana, C.D. and Fidler, I.J. (1998) Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int J Oncol*, **12**, 749-757.
- Kung, A.L., Wang, S., Klco, J.M., Kaelin, W.G. and Livingston, D.M. (2000) Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med*, **6**, 1335-1340.
- Kurachi, K., Chandra, T., Degen, S.J., White, T.T., Marchioro, T.L., Woo, S.L. and Davie, E.W. (1981) Cloning and sequence of cDNA coding for alpha 1-antitrypsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6826-6830.

- Kuwai, T., Kitadai, Y., Tanaka, S., Onogawa, S., Matsutani, N., Kaio, E., Ito, M. and Chayama, K. (2003) Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer*, **105**, 176-181.
- Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. and Petitfrere, E. (2004) TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*, **49**, 187-198.
- Lamoreaux, W.J., Fitzgerald, M.E., Reiner, A., Hasty, K.A. and Charles, S.T. (1998) Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res*, **55**, 29-42.
- Lancaster, D.E., McNeill, L.A., McDonough, M.A., Aplin, R.T., Hewitson, K.S., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Schofield, C.J. (2004) Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J*, **383**, 429-437.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L. and Bruick, R.K. (2002a) FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*, **16**, 1466-1471.
- Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J. and Whitelaw, M.L. (2002b) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, **295**, 858-861.
- Lang, K.J., Kappel, A. and Goodall, G.J. (2002) Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell*, **13**, 1792-1801.
- Langlois, M.F., Zanger, K., Monden, T., Safer, J.D., Hollenberg, A.N. and Wondisford, F.E. (1997) A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. *J Biol Chem*, **272**, 24927-24933.
- Laprise, M.H., Grondin, F., Cayer, P., McDonald, P.P. and Dubois, C.M. (2002) Furin gene (fur) regulation in differentiating human megakaryoblastic Dami cells: involvement of the proximal GATA recognition motif in the P1 promoter and impact on the maturation of furin substrates. *Blood*, **100**, 3578-3587.
- Larsson, J., Goumans, M.J., Sjostrand, L.J., van Rooijen, M.A., Ward, D., Leveen, P., Xu, X., ten Dijke, P., Mummery, C.L. and Karlsson, S. (2001) Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *Embo J*, **20**, 1663-1673.
- Leco, K.J., Apte, S.S., Taniguchi, G.T., Hawkes, S.P., Khokha, R., Schultz, G.A. and Edwards, D.R. (1997) Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett*, **401**, 213-217.
- Leco, K.J., Khokha, R., Pavloff, N., Hawkes, S.P. and Edwards, D.R. (1994) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem*, **269**, 9352-9360.
- Leduc, R., Molloy, S.S., Thorne, B.A. and Thomas, G. (1992) Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J Biol Chem*, **267**, 14304-14308.

- Lee, S.H., Shin, M.S., Lee, H.S., Bae, J.H., Lee, H.K., Kim, H.S., Kim, S.Y., Jang, J.J., Joo, M., Kang, Y.K., Park, W.S., Park, J.Y., Oh, R.R., Han, S.Y., Lee, J.H., Kim, S.H., Lee, J.Y. and Yoo, N.J. (2001) Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*, **32**, 250-256.
- Lehmann, K., Janda, E., Pierreux, C.E., Rytomaa, M., Schulze, A., McMahon, M., Hill, C.S., Beug, H. and Downward, J. (2000) Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev*, **14**, 2610-2622.
- Lehmann, M., Rigot, V., Seidah, N.G., Marvaldi, J. and Lissitzky, J.C. (1996) Lack of integrin alpha-chain endoproteolytic cleavage in furin-deficient human colon adenocarcinoma cells LoVo. *Biochem J*, **317** ( Pt 3), 803-809.
- Leroy-Dudal, J., Demeilliers, C., Gallet, O., Pauthe, E., Dutoit, S., Agniel, R., Gauduchon, P. and Carreiras, F. (2005) Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves alphav integrins and the participation of MMP2. *Int J Cancer*, **114**, 531-543.
- Letterio, J.J. and Roberts, A.B. (1998) Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*, **16**, 137-161.
- Levinson, H., Sil, A.K., Conwell, J.E., Hopper, J.E. and Ehrlich, H.P. (2004) Alpha V integrin prolongs collagenase production through Jun activation binding protein 1. *Ann Plast Surg*, **53**, 155-161.
- Li, H., Ko, H.P. and Whitlock, J.P. (1996) Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J Biol Chem*, **271**, 21262-21267.
- Li, J., Zhang, X., Sejas, D.P., Bagby, G.C. and Pang, Q. (2004) Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J Biol Chem*, **279**, 41275-41279.
- Liberati, N.T., Datto, M.B., Frederick, J.P., Shen, X., Wong, C., Rougier-Chapman, E.M. and Wang, X.F. (1999) Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4844-4849.
- Lin, E.Y. and Pollard, J.W. (2004) Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer*, **90**, 2053-2058.
- Lin, S.W., Lee, M.T., Ke, F.C., Lee, P.P., Huang, C.J., Ip, M.M., Chen, L. and Hwang, J.J. (2000) TGFbeta1 stimulates the secretion of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and the invasive behavior in human ovarian cancer cells, which is suppressed by MMP inhibitor BB3103. *Clin Exp Metastasis*, **18**, 493-499.
- Lindberg, I., van den Hurk, W.H., Bui, C. and Batie, C.J. (1995) Enzymatic characterization of immunopurified prohormone convertase 2: potent inhibition by a 7B2 peptide fragment. *Biochemistry*, **34**, 5486-5493.
- Lissitzky, J.C., Luis, J., Munzer, J.S., Benjannet, S., Parat, F., Chretien, M., Marvaldi, J. and Seidah, N.G. (2000) Endoproteolytic processing of integrin pro-alpha subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem J*, **346** Pt 1, 133-138.
- Lisztwan, J., Imbert, G., Wirbelauer, C., Gstaiger, M. and Krek, W. (1999) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev*, **13**, 1822-1833.

- Llano, E., Pendas, A.M., Freije, J.P., Nakano, A., Knauper, V., Murphy, G. and Lopez-Otin, C. (1999) Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res*, **59**, 2570-2576.
- Llorens, A., Vinyals, A., Alia, P., Lopez-Barcons, L., Gonzalez-Garrigues, M. and Fabra, A. (1997) Metastatic ability of MXT mouse mammary subpopulations correlates with clonal expression and/or membrane-association of gelatinase A. *Mol Carcinog*, **19**, 54-66.
- Lok, C.N. and Ponka, P. (2000) Identification of an erythroid active element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem*, **275**, 24185-24190.
- Lu, S.L., Reh, D., Li, A.G., Woods, J., Corless, C.L., Kulesz-Martin, M. and Wang, X.J. (2004) Overexpression of transforming growth factor beta1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. *Cancer Res*, **64**, 4405-4410.
- Lusson, J., Benjannet, S., Hamelin, J., Savaria, D., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1997) The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem J*, **326** ( Pt 3), 737-744.
- Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1993) cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6691-6695.
- Lyons, K.M., Hogan, B.L. and Robertson, E.J. (1995) Colocalization of BMP 7 and BMP 2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech Dev*, **50**, 71-83.
- Lyons, R.M., Gentry, L.E., Purchio, A.F. and Moses, H.L. (1990) Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol*, **110**, 1361-1367.
- MacDougall, J.R., Bani, M.R., Lin, Y., Rak, J. and Kerbel, R.S. (1995) The 92-kDa gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells: suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells. *Cancer Res*, **55**, 4174-4181.
- Madisen, L., Webb, N.R., Rose, T.M., Marquardt, H., Ikeda, T., Twardzik, D., Seyedin, S. and Purchio, A.F. (1988) Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA*, **7**, 1-8.
- Maehara, Y., Kakeji, Y., Kabashima, A., Emi, Y., Watanabe, A., Akazawa, K., Baba, H., Kohnoe, S. and Sugimachi, K. (1999) Role of transforming growth factor-beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *J Clin Oncol*, **17**, 607-614.
- Mains, R.E., Berard, C.A., Denault, J.B., Zhou, A., Johnson, R.C. and Leduc, R. (1997) PACE4: a subtilisin-like endoprotease with unique properties. *Biochem J*, **321** ( Pt 3), 587-593.
- Maisner, A., Mrkic, B., Herrler, G., Moll, M., Billeter, M.A., Cattaneo, R. and Klenk, H.D. (2000) Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity. *J Gen Virol*, **81**, 441-449.
- Malide, D., Seidah, N.G., Chretien, M. and Bendayan, M. (1995) Electron microscopic immunocytochemical evidence for the involvement of the convertases PC1 and

- PC2 in the processing of proinsulin in pancreatic beta-cells. *J Histochem Cytochem*, **43**, 11-19.
- Malumbres, M. and Carnero, A. (2003) Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res*, **5**, 5-18.
- Manalo, D.J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B.D., Ye, S.Q., Garcia, J.G. and Semenza, G.L. (2005) Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*, **105**, 659-669.
- Mantovani, A., Allavena, P. and Sica, A. (2004) Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer*, **40**, 1660-1667.
- Maquoi, E., Noel, A., Frankenhe, F., Angliker, H., Murphy, G. and Foidart, J.M. (1998) Inhibition of matrix metalloproteinase 2 maturation and HT1080 invasiveness by a synthetic furin inhibitor. *FEBS Lett*, **424**, 262-266.
- Marcinkiewicz, M., Day, R., Seidah, N.G. and Chretien, M. (1993) Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4922-4926.
- Marcinkiewicz, M., Ramla, D., Seidah, N.G. and Chretien, M. (1994) Developmental expression of the prohormone convertases PC1 and PC2 in mouse pancreatic islets. *Endocrinology*, **135**, 1651-1660.
- Massague, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **67**, 753-791.
- Massague, J. and Like, B. (1985) Cellular receptors for type beta transforming growth factor. Ligand binding and affinity labeling in human and rodent cell lines. *J Biol Chem*, **260**, 2636-2645.
- Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J*, **20**, 5197-5206.
- Matsushita, M., Matsuzaki, K., Date, M., Watanabe, T., Shibano, K., Nakagawa, T., Yanagitani, S., Amoh, Y., Takemoto, H., Ogata, N., Yamamoto, C., Kubota, Y., Seki, T., Inokuchi, H., Nishizawa, M., Takada, H., Sawamura, T., Okamura, A. and Inoue, K. (1999) Down-regulation of TGF-beta receptors in human colorectal cancer: implications for cancer development. *Br J Cancer*, **80**, 194-205.
- Matthews, G., Shennan, K.I., Seal, A.J., Taylor, N.A., Colman, A. and Docherty, K. (1994) Autocatalytic maturation of the prohormone convertase PC2. *J Biol Chem*, **269**, 588-592.
- Maxwell, P.H., Dachs, G.U., Gleadle, J.M., Nicholls, L.G., Harris, A.L., Stratford, I.J., Hankinson, O., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8104-8109.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. and Ratcliffe, P.J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271-275.
- Mbikay, M., Sirois, F., Yao, J., Seidah, N.G. and Chretien, M. (1997a) Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours. *Br J Cancer*, **75**, 1509-1514.

- Mbikay, M., Tadros, H., Ishida, N., Lerner, C.P., De Lamirande, E., Chen, A., El-Alfy, M., Clermont, Y., Seidah, N.G., Chretien, M., Gagnon, C. and Simpson, E.M. (1997b) Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6842-6846.
- McCawley, L.J. and Matrisian, L.M. (2000) Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today*, **6**, 149-156.
- McCrudden, K.W., Hopkins, B., Frischer, J., Novikov, A., Huang, J., Kadenhe, A., New, T., Yokoi, A., Yamashiro, D.J., Kandel, J.J. and Middlesworth, W. (2003) Anti-VEGF antibody in experimental hepatoblastoma: suppression of tumor growth and altered angiogenesis. *J Pediatr Surg*, **38**, 308-314; discussion 308-314.
- McDonald, P.P., Fadok, V.A., Bratton, D. and Henson, P.M. (1999) Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol*, **163**, 6164-6172.
- McKee, M.L. and FitzGerald, D.J. (1999) Reduction of furin-nicked Pseudomonas exotoxin A: an unfolding story. *Biochemistry*, **38**, 16507-16513.
- McMahon, S., Grondin, F., McDonald, P.P., Darren, R.E. and Dubois, C.M. (2004) Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by HIF-1: Impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem*.
- McMahon, S., Laprise, M.H. and Dubois, C.M. (2003) Alternative pathway for the role of furin in tumor cell invasion process. Enhanced MMP-2 levels through bioactive TGFbeta. *Exp Cell Res*, **291**, 326-339.
- Medema, R.H. and Bos, J.L. (1993) The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog*, **4**, 615-661.
- Meerabux, J., Yaspo, M.L., Roebroek, A.J., Van de Ven, W.J., Lister, T.A. and Young, B.D. (1996) A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas. *Cancer Res*, **56**, 448-451.
- Melillo, G., Taylor, L.S., Brooks, A., Musso, T., Cox, G.W. and Varesio, L. (1997) Functional requirement of the hypoxia-responsive element in the activation of the inducible nitric oxide synthase promoter by the iron chelator desferrioxamine. *J Biol Chem*, **272**, 12236-12243.
- Mercapide, J., Lopez De Cicco, R., Bassi, D.E., Castresana, J.S., Thomas, G. and Klein-Szanto, A.J. (2002) Inhibition of furin-mediated processing results in suppression of astrocytoma cell growth and invasiveness. *Clin Cancer Res*, **8**, 1740-1746.
- Mercier, P. and Ekindjian, O.G. (1990) [Collagen type IV: major component of basement membranes. Current knowledge]. *Ann Biol Clin (Paris)*, **48**, 695-711.
- Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J.H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W.Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W., Acker, H. and Fandrey, J. (2003a) Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci*, **116**, 1319-1326.
- Metzen, E., Stiehl, D.P., Doege, K., Marxsen, J.H., Hellwig-Burgel, T. and Jelkmann, W. (2004) Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: Identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem J*.
- Metzen, E., Zhou, J., Jelkmann, W., Fandrey, J. and Brune, B. (2003b) Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell*, **14**, 3470-3481.



- Michel, G., Minet, E., Mottet, D., Remacle, J. and Michiels, C. (2002) Site-directed mutagenesis studies of the hypoxia-inducible factor-1alpha DNA-binding domain. *Biochim Biophys Acta*, **1578**, 73-83.
- Michor, F., Iwasa, Y. and Nowak, M.A. (2004) Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **4**, 197-205.
- Miller, D.M., Ogawa, Y., Iwata, K.K., ten Dijke, P., Purchio, A.F., Soloff, M.S. and Gentry, L.E. (1992) Characterization of the binding of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 to recombinant beta 1-latency-associated peptide. *Mol Endocrinol*, **6**, 694-702.
- Miranda, L., Wolf, J., Pichuanes, S., Duke, R. and Franzusoff, A. (1996) Isolation of the human PC6 gene encoding the putative host protease for HIV-1 gp160 processing in CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7695-7700.
- Miyake, H., Yoshimura, K., Hara, I., Eto, H., Arakawa, S. and Kamidono, S. (1997) Basic fibroblast growth factor regulates matrix metalloproteinases production and in vitro invasiveness in human bladder cancer cell lines. *J Urol*, **157**, 2351-2355.
- Miyazaki, K., Kawamoto, T., Tanimoto, K., Nishiyama, M., Honda, H. and Kato, Y. (2002) Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes. *J Biol Chem*, **277**, 47014-47021.
- Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P. and Heldin, C.H. (1991) A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *Embo J*, **10**, 1091-1101.
- Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S. and Matsuo, H. (1988) Yeast KEX2 genes encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases. *Biochem Biophys Res Commun*, **156**, 246-254.
- Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S. and Matsuo, H. (1989) Characterization of KEX2-encoded endopeptidase from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **159**, 305-311.
- Molloy, S.S., Anderson, E.D., Jean, F. and Thomas, G. (1999) Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol*, **9**, 28-35.
- Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R. and Thomas, G. (1992) Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem*, **267**, 16396-16402.
- Molloy, S.S., Thomas, L., Kamibayashi, C., Mumby, M.C. and Thomas, G. (1998) Regulation of endosome sorting by a specific PP2A isoform. *J Cell Biol*, **142**, 1399-1411.
- Molloy, S.S., Thomas, L., VanSlyke, J.K., Stenberg, P.E. and Thomas, G. (1994) Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *Embo J*, **13**, 18-33.
- Montgomery, E., Goggins, M., Zhou, S., Argani, P., Wilentz, R., Kaushal, M., Booker, S., Romans, K., Bhargava, P., Hruban, R. and Kern, S. (2001) Nuclear localization of Dpc4 (Madh4, Smad4) in colorectal carcinomas and relation to mismatch repair/transforming growth factor-beta receptor defects. *Am J Pathol*, **158**, 537-542.
- Mori, K., Imamaki, A., Nagata, K., Yonetomi, Y., Kiyokage-Yoshimoto, R., Martin, T.J., Gillespie, M.T., Nagahama, M., Tsuji, A. and Matsuda, Y. (1999) Subtilisin-like

- proprotein convertases, PACE4 and PC8, as well as furin, are endogenous proalbumin convertases in HepG2 cells. *J Biochem (Tokyo)*, **125**, 627-633.
- Mori, Y., Ishida, W., Bhattacharyya, S., Li, Y., Platanias, L.C. and Varga, J. (2004) Selective inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling blocks profibrotic transforming growth factor beta responses in skin fibroblasts. *Arthritis Rheum*, **50**, 4008-4021.
- Moses, H.L., Coffey, R.J., Jr., Leof, E.B., Lyons, R.M. and Keski-Oja, J. (1987) Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation. *J Cell Physiol Suppl*, **Suppl 5**, 1-7.
- Moulard, M. and Decroly, E. (2000) Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim Biophys Acta*, **1469**, 121-132.
- Moulard, M., Hallenberger, S., Garten, W. and Klenk, H.D. (1999) Processing and routage of HIV glycoproteins by furin to the cell surface. *Virus Res*, **60**, 55-65.
- Mulder, K.M. (2000) Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, **11**, 23-35.
- Mulder, K.M., Humphrey, L.E., Choi, H.G., Childress-Fields, K.E. and Brattain, M.G. (1990) Evidence for c-myc in the signaling pathway for TGF-beta in well-differentiated human colon carcinoma cells. *J Cell Physiol*, **145**, 501-507.
- Muller, L. and Lindberg, I. (1999) The cell biology of the prohormone convertases PC1 and PC2. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **63**, 69-108.
- Munger, J.S., Harpel, J.G., Gleizes, P.E., Mazzieri, R., Nunes, I. and Rifkin, D.B. (1997) Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int*, **51**, 1376-1382.
- Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., Rifkin, D.B. and Sheppard, D. (1999) The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*, **96**, 319-328.
- Munzer, J.S., Basak, A., Zhong, M., Mamarbachi, A., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Hendy, G.N., Benjannet, S., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1997) In vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7. *J Biol Chem*, **272**, 19672-19681.
- Muraoka-Cook, R.S., Kurokawa, H., Koh, Y., Forbes, J.T., Roebuck, L.R., Barcellos-Hoff, M.H., Moody, S.E., Chodosh, L.A. and Arteaga, C.L. (2004) Conditional overexpression of active transforming growth factor betal in vivo accelerates metastases of transgenic mammary tumors. *Cancer Res*, **64**, 9002-9011.
- Nachtigal, M.W. and Ingraham, H.A. (1996) Bioactivation of Mullerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/subtilisin-like endoprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7711-7716.
- Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W.K. and Huang, H.J. (1996) A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res*, **56**, 5079-5086.
- Nagase, H. and Woessner, J.F., Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, **274**, 21491-21494.
- Nakagawa, T., Hosaka, M., Torii, S., Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1993a) Identification and functional expression of a new member of the

- mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *J Biochem (Tokyo)*, **113**, 132-135.
- Nakagawa, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1993b) Identification of an isoform with an extremely large Cys-rich region of PC6, a Kex2-like processing endoprotease. *FEBS Lett*, **327**, 165-171.
- Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K. and Shimizu, S. (1989) Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*, **342**, 440-443.
- Nakanishi, Y., Kodama, J., Yoshinouchi, M., Tokumo, K., Kamimura, S., Okuda, H. and Kudo, T. (1997) The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol*, **16**, 256-262.
- Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C.H., Miyazono, K. and ten Dijke, P. (1997) TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Embo J*, **16**, 5353-5362.
- Nakayama, K. (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J*, **327** ( Pt 3), 625-635.
- Nakayama, K., Kim, W.S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T. and Murakami, K. (1992) Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. Its testis-specific expression. *J Biol Chem*, **267**, 5897-5900.
- Nejjari, M., Berthet, V., Rigot, V., Laforest, S., Jacquier, M.F., Seidah, N.G., Remy, L., Bruyneel, E., Scoazec, J.Y., Marvaldi, J. and Luis, J. (2004) Inhibition of proprotein convertases enhances cell migration and metastases development of human colon carcinoma cells in a rat model. *Am J Pathol*, **164**, 1925-1933.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. and Poltorak, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*, **13**, 9-22.
- Newell, K.J., Witty, J.P., Rodgers, W.H. and Matrisian, L.M. (1994) Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Mol Carcinog*, **10**, 199-206.
- Nishi, H., Nakada, T., Kyo, S., Inoue, M., Shay, J.W. and Isaka, K. (2004) Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol Cell Biol*, **24**, 6076-6083.
- Oda, K., Ikeda, M., Tsuji, E., Sohda, M., Takami, N., Misumi, Y. and Ikehara, Y. (1991) Sequence requirements for proteolytic cleavage of precursors with paired basic amino acids. *Biochem Biophys Res Commun*, **179**, 1181-1186.
- Ohh, M., Park, C.W., Ivan, M., Hoffman, M.A., Kim, T.Y., Huang, L.E., Pavletich, N., Chau, V. and Kaelin, W.G. (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*, **2**, 423-427.
- Oley, M., Letzel, M.C. and Ragg, H. (2004) Inhibition of furin by serpin Spn4A from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*, **577**, 165-169.
- Oshima, M., Oshima, H. and Taketo, M.M. (1996) TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol*, **179**, 297-302.

- Owen, M.C., Brennan, S.O., Lewis, J.H. and Carrell, R.W. (1983) Mutation of antitrypsin to antithrombin.  $\alpha$  1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N Engl J Med*, **309**, 694-698.
- Page, E.L., Robitaille, G.A., Pouyssegur, J. and Richard, D.E. (2002) Induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem*, **277**, 48403-48409.
- Parsons, S.L., Watson, S.A., Brown, P.D., Collins, H.M. and Steele, R.J. (1997) Matrix metalloproteinases. *Br J Surg*, **84**, 160-166.
- Pasche, B. (2001) Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol*, **186**, 153-168.
- Patel, B., Khaliq, A., Jarvis-Evans, J., McLeod, D., Mackness, M. and Boulton, M. (1994) Oxygen regulation of TGF-beta 1 mRNA in human hepatoma (Hep G2) cells. *Biochem Mol Biol Int*, **34**, 639-644.
- Patil, S., Wildey, G.M., Brown, T.L., Choy, L., Derynck, R. and Howe, P.H. (2000) Smad7 is induced by CD40 and protects WEHI 231 B-lymphocytes from transforming growth factor-beta -induced growth inhibition and apoptosis. *J Biol Chem*, **275**, 38363-38370.
- Pei, D. (1999) Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J Biol Chem*, **274**, 8925-8932.
- Pei, D., Kang, T. and Qi, H. (2000) Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J Biol Chem*, **275**, 33988-33997.
- Pei, D. and Weiss, S.J. (1995) Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*, **375**, 244-247.
- Pepper, M.S., Belin, D., Montesano, R., Orci, L. and Vassalli, J.D. (1990) Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol*, **111**, 743-755.
- Perlmutter, D.H. and Pierce, J.A. (1989) The alpha 1-antitrypsin gene and emphysema. *Am J Physiol*, **257**, L147-162.
- Pirtskhalaishvili, G. and Nelson, J.B. (2000) Endothelium-derived factors as paracrine mediators of prostate cancer progression. *Prostate*, **44**, 77-87.
- Posthaus, H., Dubois, C.M. and Muller, E. (2003) Novel insights into cadherin processing by subtilisin-like convertases. *FEBS Lett*, **536**, 203-208.
- Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M. and Ratcliffe, P.J. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*, **272**, 11205-11214.
- Pullikotil, P., Vincent, M., Nichol, S.T. and Seidah, N.G. (2004) Development of protein-based inhibitors of the proprotein convertase SKI-1/S1P: processing of SREBP-2, ATF6, and a viral glycoprotein. *J Biol Chem*, **279**, 17338-17347.
- Pulyaeva, H., Bueno, J., Polette, M., Birembaut, P., Sato, H., Seiki, M. and Thompson, E.W. (1997) MT1-MMP correlates with MMP-2 activation potential seen after epithelial to mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis*, **15**, 111-120.
- Puyraimond, A., Weitzman, J.B., Babiola, E. and Menashi, S. (1999) Examining the relationship between the gelatinolytic balance and the invasive capacity of endothelial cells. *J Cell Sci*, **112** ( Pt 9), 1283-1290.

- Qian, D., Lin, H.Y., Wang, H.M., Zhang, X., Liu, D.L., Li, Q.L. and Zhu, C. (2004) Normoxic induction of the hypoxic-inducible factor-1 alpha by interleukin-1 beta involves the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in normal human cytotrophoblast cells. *Biol Reprod*, **70**, 1822-1827.
- Rafty, L.A. and Khachigian, L.M. (2000) Novel negative regulatory element in the platelet-derived growth factor B chain promoter that mediates ERK-dependent transcriptional repression. *J Biol Chem*, **275**, 11478-11483.
- Raught, B., Gingras, A.C. and Sonenberg, N. (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7037-7044.
- Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z.M., Sutter, C.H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L.E., Madan, A., Semenza, G.L. and Bedi, A. (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev*, **14**, 34-44.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A. and Massague, J. (1995) Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev*, **9**, 1831-1845.
- Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D. and Pouyssegur, J. (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*, **274**, 32631-32637.
- Richard, D.E., Berra, E. and Pouyssegur, J. (2000) Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **275**, 26765-26771.
- Richer, M.J., Keays, C.A., Waterhouse, J., Minhas, J., Hashimoto, C. and Jean, F. (2004) The Spn4 gene of *Drosophila* encodes a potent furin-directed secretory pathway serpin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10560-10565.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Wakefield, L.M., Roche, N.S., Stern, D.F. and Sporn, M.B. (1985) Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 119-123.
- Roberts, A.B., Kim, S.J., Noma, T., Glick, A.B., Lafyatis, R., Lechleider, R., Jakowlew, S.B., Geiser, A., O'Reilly, M.A., Danielpour, D. and et al. (1991) Multiple forms of TGF-beta: distinct promoters and differential expression. *Ciba Found Symp*, **157**, 7-15; discussion 15-28.
- Roberts, A.B., Lamb, L.C., Newton, D.L., Sporn, M.B., De Larco, J.E. and Todaro, G.J. (1980) Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 3494-3498.
- Roberts, A.B. and Wakefield, L.M. (2003) The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8621-8623.
- Roebroek, A.J., Creemers, J.W., Pauli, I.G., Kurzik-Dumke, U., Rentrop, M., Gateff, E.A., Leunissen, J.A. and Van de Ven, W.J. (1992) Cloning and functional expression of Dfurin2, a subtilisin-like proprotein processing enzyme of *Drosophila melanogaster* with multiple repeats of a cysteine motif. *J Biol Chem*, **267**, 17208-17215.
- Roebroek, A.J., Schalken, J.A., Bussemakers, M.J., van Heerikhuizen, H., Onnekink, C., Debruyne, F.M., Bloemers, H.P. and Van de Ven, W.J. (1986a) Characterization

- of human c-fes/fps reveals a new transcription unit (fur) in the immediately upstream region of the proto-oncogene. *Mol Biol Rep*, **11**, 117-125.
- Roebroek, A.J., Schalken, J.A., Leunissen, J.A., Onnekink, C., Bloemers, H.P. and Van de Ven, W.J. (1986b) Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *Embo J*, **5**, 2197-2202.
- Roebroek, A.J., Taylor, N.A., Louagie, E., Pauli, I., Smeijers, L., Snellinx, A., Lauwers, A., Van de Ven, W.J., Hartmann, D. and Creemers, J.W. (2004) Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver. *J Biol Chem*, **279**, 53442-53450.
- Roebroek, A.J., Umans, L., Pauli, I.G., Robertson, E.J., van Leuven, F., Van de Ven, W.J. and Constam, D.B. (1998) Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development*, **125**, 4863-4876.
- Rolli, M., Fransvea, E., Pilch, J., Saven, A. and Felding-Habermann, B. (2003) Activated integrin  $\alpha v \beta 3$  cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9482-9487.
- Rouille, Y., Duguay, S.J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., Oliva, A.A., Jr., Chan, S.J. and Steiner, D.F. (1995) Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Front Neuroendocrinol*, **16**, 322-361.
- Rovere, C., Barbero, P., Maoret, J.J., Laburthe, M. and Kitabgi, P. (1998) Pro-neurotensin/neuromedin N expression and processing in human colon cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, **246**, 155-159.
- Rovere, C., Luis, J., Lissitzky, J.C., Basak, A., Marvaldi, J., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1999) The RGD motif and the C-terminal segment of proprotein convertase 1 are critical for its cellular trafficking but not for its intracellular binding to integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . *J Biol Chem*, **274**, 12461-12467.
- Rozanov, D.V., Deryugina, E.I., Ratnikov, B.I., Monosov, E.Z., Marchenko, G.N., Quigley, J.P. and Strongin, A.Y. (2001) Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys(574), the active site Glu(240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells. *J Biol Chem*, **276**, 25705-25714.
- Runyan, C.E., Schnaper, H.W. and Poncelet, A.C. (2004) The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway enhances Smad3-stimulated mesangial cell collagen I expression in response to transforming growth factor- $\beta 1$ . *J Biol Chem*, **279**, 2632-2639.
- Safran, M. and Kaelin, W.G., Jr. (2003) HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest*, **111**, 779-783.
- Saito, H., Tsujitani, S., Oka, S., Kondo, A., Ikeguchi, M., Maeta, M. and Kaibara, N. (1999) The expression of transforming growth factor- $\beta 1$  is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer*, **86**, 1455-1462.
- Salceda, S. and Caro, J. (1997) Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions.

- Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*, **272**, 22642-22647.
- Salnikow, K., Donald, S.P., Bruick, R.K., Zhitkovich, A., Phang, J.M. and Kasprzak, K.S. (2004) Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem*, **279**, 40337-40344.
- Salovaara, R., Roth, S., Loukola, A., Launonen, V., Sistonen, P., Avizienyte, E., Kristo, P., Jarvinen, H., Souhelnytskyi, S., Sarlomo-Rikala, M. and Aaltonen, L.A. (2002) Frequent loss of SMAD4/DPC4 protein in colorectal cancers. *Gut*, **51**, 56-59.
- Sanchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Corbi, A., Attisano, L. and Bernabeu, C. (2001) Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem*, **276**, 38527-38535.
- Sanchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Langa, C. and Bernabeu, C. (2002) Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*, **277**, 43799-43808.
- Sanchez-Elsner, T., Ramirez, J.R., Sanz-Rodriguez, F., Varela, E., Bernabeu, C. and Botella, L.M. (2004) A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. *J Mol Biol*, **336**, 9-24.
- Sandau, K.B., Zhou, J., Kietzmann, T. and Brune, B. (2001) Regulation of the hypoxia-inducible factor 1alpha by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide. *J Biol Chem*, **276**, 39805-39811.
- Sang, N., Stiehl, D.P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V. and Caro, J. (2003) MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem*, **278**, 14013-14019.
- Santibanez, J.F., Guerrero, J., Quintanilla, M., Fabra, A. and Martinez, J. (2002) Transforming growth factor-beta1 modulates matrix metalloproteinase-9 production through the Ras/MAPK signaling pathway in transformed keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 267-273.
- Sasaki, K., Hattori, T., Fujisawa, T., Takahashi, K., Inoue, H. and Takigawa, M. (1998) Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem (Tokyo)*, **123**, 431-439.
- Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K. and Seiki, M. (1996) Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett*, **393**, 101-104.
- Sato, T., Kondo, T., Fujisawa, T., Seiki, M. and Ito, A. (1999) Furin-independent pathway of membrane type 1-matrix metalloproteinase activation in rabbit dermal fibroblasts. *J Biol Chem*, **274**, 37280-37284.
- Sato, Y. and Rifkin, D.B. (1989) Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol*, **109**, 309-315.

- Schafer, M.K., Day, R., Cullinan, W.E., Chretien, M., Seidah, N.G. and Watson, S.J. (1993) Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: a comparative in situ hybridization analysis. *J Neurosci*, **13**, 1258-1279.
- Schalken, J.A., Roebroek, A.J., Oomen, P.P., Wagenaar, S.S., Debruyne, F.M., Bloemers, H.P. and Van de Ven, W.J. (1987) fur gene expression as a discriminating marker for small cell and nonsmall cell lung carcinomas. *J Clin Invest*, **80**, 1545-1549.
- Schultz-Cherry, S. and Murphy-Ullrich, J.E. (1993) Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol*, **122**, 923-932.
- Sehgal, I. and Thompson, T.C. (1999) Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell*, **10**, 407-416.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S.B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A. and Chretien, M. (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 928-933.
- Seidah, N.G. and Chretien, M. (1997) Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr Opin Biotechnol*, **8**, 602-607.
- Seidah, N.G., Chretien, M. and Day, R. (1994) The family of subtilisin/kexin like proprotein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie*, **76**, 197-209.
- Seidah, N.G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M.W. and Chretien, M. (1992) Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol Endocrinol*, **6**, 1559-1570.
- Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M. and Chretien, M. (1998) Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann N Y Acad Sci*, **839**, 9-24.
- Seidah, N.G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M. and Chretien, M. (1990) cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol*, **9**, 415-424.
- Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tardos, H., Mbikay, M., Chretien, M. and Day, R. (1996) cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3388-3393.
- Seidah, N.G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M.G., Lazure, C., Mbikay, M. and Chretien, M. (1991) Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol Endocrinol*, **5**, 111-122.
- Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Toure, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J.C., Lazure, C., Murphy, R.A., Chretien, M. and Marcinkiewicz, M. (1999) Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1321-1326.



- Seiki, M. (2003) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett*, **194**, 1-11.
- Semenza, G. (2002) Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*, **64**, 993-998.
- Semenza, G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3**, 721-732.
- Semenza, G.L., Rue, E.A., Iyer, N.V., Pang, M.G. and Kearns, W.G. (1996) Assignment of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene to a region of conserved synteny on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genomics*, **34**, 437-439.
- Semenza, G.L. and Wang, G.L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, **12**, 5447-5454.
- Shapiro, J., Sciaky, N., Lee, J., Bosshart, H., Angeletti, R.H. and Bonifacino, J.S. (1997) Localization of endogenous furin in cultured cell lines. *J Histochem Cytochem*, **45**, 3-12.
- Shay, J.W. and Bacchetti, S. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, **33**, 787-791.
- Shigeoka, Y., Igishi, T., Matsumoto, S., Nakanishi, H., Kodani, M., Yasuda, K., Hitsuda, Y. and Shimizu, E. (2004) Sulindac sulfide and caffeic acid phenethyl ester suppress the motility of lung adenocarcinoma cells promoted by transforming growth factor-beta through Akt inhibition. *J Cancer Res Clin Oncol*, **130**, 146-152.
- Shih, S.C. and Claffey, K.P. (2001) Role of AP-1 and HIF-1 transcription factors in TGF-beta activation of VEGF expression. *Growth Factors*, **19**, 19-34.
- Shimada, T., Nakamura, H., Yamashita, K., Kawata, R., Murakami, Y., Fujimoto, N., Sato, H., Seiki, M. and Okada, Y. (2000) Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human oral squamous cell carcinomas: implications for lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis*, **18**, 179-188.
- Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A. and Orkin, S.H. (1997) A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *Embo J*, **16**, 3965-3973.
- Shofuda, K., Moriyama, K., Nishihashi, A., Higashi, S., Mizushima, H., Yasumitsu, H., Miki, K., Sato, H., Seiki, M. and Miyazaki, K. (1998) Role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in regulation of pro-gelatinase A activation catalyzed by membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) in human cancer cells. *J Biochem (Tokyo)*, **124**, 462-470.
- Siegfried, G., Basak, A., Cromlish, J.A., Benjannet, S., Marcinkiewicz, J., Chretien, M., Seidah, N.G. and Khatib, A.M. (2003a) The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest*, **111**, 1723-1732.
- Siegfried, G., Khatib, A.M., Benjannet, S., Chretien, M. and Seidah, N.G. (2003b) The proteolytic processing of pro-platelet-derived growth factor-A at RRKR(86) by members of the proprotein convertase family is functionally correlated to platelet-derived growth factor-A-induced functions and tumorigenicity. *Cancer Res*, **63**, 1458-1463.
- Smeekens, S.P., Avruch, A.S., LaMendola, J., Chan, S.J. and Steiner, D.F. (1991) Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase

- related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 340-344.
- Smeekens, S.P., Chan, S.J. and Steiner, D.F. (1992) The biosynthesis and processing of neuroendocrine peptides: identification of proprotein convertases involved in intravesicular processing. *Prog Brain Res*, **92**, 235-246.
- Smeekens, S.P. and Steiner, D.F. (1990) Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J Biol Chem*, **265**, 2997-3000.
- Solloway, M.J. and Robertson, E.J. (1999) Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development*, **126**, 1753-1768.
- Sounni, N.E., Devy, L., Hajitou, A., Frankenke, F., Munaut, C., Gilles, C., Deroanne, C., Thompson, E.W., Foidart, J.M. and Noel, A. (2002) MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Faseb J*, **16**, 555-564.
- Sounni, N.E., Janssen, M., Foidart, J.M. and Noel, A. (2003) Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol*, **22**, 55-61.
- Sowter, H.M., Raval, R.R., Moore, J.W., Ratcliffe, P.J. and Harris, A.L. (2003) Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res*, **63**, 6130-6134.
- Spencer-Cisek, P.A. (2002) The role of growth factors in malignancy: a focus on the epidermal growth factor receptor. *Semin Oncol Nurs*, **18**, 13-19.
- Sprecher, C.A., Morgenstern, K.A., Mathewes, S., Dahlen, J.R., Schrader, S.K., Foster, D.C. and Kisiel, W. (1995) Molecular cloning, expression, and partial characterization of two novel members of the ovalbumin family of serine proteinase inhibitors. *J Biol Chem*, **270**, 29854-29861.
- Springman, E.B., Angleton, E.L., Birkedal-Hansen, H. and Van Wart, H.E. (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 364-368.
- Srour, N., Lebel, A., McMahon, S., Fournier, I., Fugere, M., Day, R. and Dubois, C.M. (2003) TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity. *FEBS Lett*, **554**, 275-283.
- Stearns, M.E., Garcia, F.U., Fudge, K., Rhim, J. and Wang, M. (1999) Role of interleukin 10 and transforming growth factor beta1 in the angiogenesis and metastasis of human prostate primary tumor lines from orthotopic implants in severe combined immunodeficiency mice. *Clin Cancer Res*, **5**, 711-720.
- Steiner, D.F. (1998) The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol*, **2**, 31-39.
- Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L. and Aten, B. (1967) Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science*, **157**, 697-700.
- Sternlicht, M.D. and Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 463-516.
- Stetler-Stevenson, W.G. and Yu, A.E. (2001) Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol*, **11**, 143-152.

- Stiehl, D.P., Jelkmann, W., Wenger, R.H. and Hellwig-Burgel, T. (2002) Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by insulin and interleukin-1 $\beta$  involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett*, **512**, 157-162.
- Stoeltzing, O., McCarty, M.F., Wey, J.S., Fan, F., Liu, W., Belcheva, A., Bucana, C.D., Semenza, G.L. and Ellis, L.M. (2004) Role of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 946-956.
- Streit, M. and Detmar, M. (2003) Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene*, **22**, 3172-3179.
- Stupack, D.G. and Cheresh, D.A. (2004) Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol*, **64**, 207-238.
- Sucic, J.F., Moehring, J.M., Inocencio, N.M., Luchini, J.W. and Moehring, T.J. (1999) Endoprotease PACE4 is Ca<sup>2+</sup>-dependent and temperature-sensitive and can partly rescue the phenotype of a furin-deficient cell strain. *Biochem J*, **339** ( Pt 3), 639-647.
- Sugano, Y., Matsuzaki, K., Tahashi, Y., Furukawa, F., Mori, S., Yamagata, H., Yoshida, K., Matsushita, M., Nishizawa, M., Fujisawa, J. and Inoue, K. (2003) Distortion of autocrine transforming growth factor  $\beta$  signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF production in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*, **22**, 2309-2321.
- Tacchini, L., Dansi, P., Matteucci, E. and Desiderio, M.A. (2001) Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis*, **22**, 1363-1371.
- Tacchini, L., De Ponti, C., Matteucci, E., Follis, R. and Desiderio, M.A. (2004) Hepatocyte growth factor-activated NF- $\kappa$ B regulates HIF-1 activity and ODC expression, implicated in survival, differently in different carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*, **25**, 2089-2100.
- Tadros, H., Chretien, M. and Mbikay, M. (2001) The testicular germ-cell protease PC4 is also expressed in macrophage-like cells of the ovary. *J Reprod Immunol*, **49**, 133-152.
- Takahashi, S., Kasai, K., Hatsuzawa, K., Kitamura, N., Misumi, Y., Ikehara, Y., Murakami, K. and Nakayama, K. (1993) A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **195**, 1019-1026.
- Takahashi, S., Nakagawa, T., Kasai, K., Banno, T., Duguay, S.J., Van de Ven, W.J., Murakami, K. and Nakayama, K. (1995) A second mutant allele of furin in the processing-incompetent cell line, LoVo. Evidence for involvement of the homo B domain in autocatalytic activation. *J Biol Chem*, **270**, 26565-26569.
- Takehana, T., Kunitomo, K., Suzuki, S., Kono, K., Fujii, H., Matsumoto, Y. and Ooi, A. (2003) Expression of epidermal growth factor receptor in gastric carcinomas. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **1**, 438-445.
- Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Harris, A.L. (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*, **157**, 411-421.
- Taylor, N.A., Van De Ven, W.J. and Creemers, J.W. (2003) Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *Faseb J*, **17**, 1215-1227.

- Teraoka, H., Sawada, T., Nishihara, T., Yashiro, M., Ohira, M., Ishikawa, T., Nishino, H. and Hirakawa, K. (2001) Enhanced VEGF production and decreased immunogenicity induced by TGF-beta 1 promote liver metastasis of pancreatic cancer. *Br J Cancer*, **85**, 612-617.
- Tetu, B., Brisson, J., Lapointe, H. and Bernard, P. (1998) Prognostic significance of stromelysin 3, gelatinase A, and urokinase expression in breast cancer. *Hum Pathol*, **29**, 979-985.
- Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 753-766.
- Thomas, G., Thorne, B.A., Thomas, L., Allen, R.G., Hruby, D.E., Fuller, R. and Thorner, J. (1988) Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science*, **241**, 226-230.
- Tian, H., McKnight, S.L. and Russell, D.W. (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*, **11**, 72-82.
- Toth, M., Gervasi, D.C. and Fridman, R. (1997) Phorbol ester-induced cell surface association of matrix metalloproteinase-9 in human MCF10A breast epithelial cells. *Cancer Res*, **57**, 3159-3167.
- Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Monthouel-Kartmann, M.N. and Van Obberghen, E. (2005) Regulation of HIF-1 activity and expression of HIF hydroxylases in response to IGF-1. *Mol Endocrinol*.
- Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Semenza, G.L. and Van Obberghen, E. (2002) Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*, **277**, 27975-27981.
- Tsuji, A., Higashine, K., Hine, C., Mori, K., Tamai, Y., Nagamune, H. and Matsuda, Y. (1994) Identification of novel cDNAs encoding human kexin-like protease, PACE4 isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, **200**, 943-950.
- Tsuji, A., Hine, C., Tamai, Y., Yonemoto, K., Mori, K., Yoshida, S., Bando, M., Sakai, E., Akamatsu, T. and Matsuda, Y. (1997) Genomic organization and alternative splicing of human PACE4 (SPC4), kexin-like processing endoprotease. *J Biochem (Tokyo)*, **122**, 438-452.
- Ueda, K., Lipkind, G.M., Zhou, A., Zhu, X., Kuznetsov, A., Philipson, L., Gardner, P., Zhang, C. and Steiner, D.F. (2003) Mutational analysis of predicted interactions between the catalytic and P domains of prohormone convertase 3 (PC3/PC1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5622-5627.
- Ueki, N., Nakazato, M., Ohkawa, T., Ikeda, T., Amuro, Y., Hada, T. and Higashino, K. (1992) Excessive production of transforming growth-factor beta 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth. *Biochim Biophys Acta*, **1137**, 189-196.
- Uden, A.B., Sandstedt, B., Bruce, K., Hedblad, M. and Stahle-Backdahl, M. (1996) Stromelysin-3 mRNA associated with myofibroblasts is overexpressed in aggressive basal cell carcinoma and in dermatofibroma but not in dermatofibrosarcoma. *J Invest Dermatol*, **107**, 147-153.
- Valdes, F., Murillo, M.M., Valverde, A.M., Herrera, B., Sanchez, A., Benito, M., Fernandez, M. and Fabregat, I. (2004) Transforming growth factor-beta activates

- both pro-apoptotic and survival signals in fetal rat hepatocytes. *Exp Cell Res*, **292**, 209-218.
- van den Ouweland, A.M., van Duijnhoven, H.L., Keizer, G.D., Dorssers, L.C. and Van de Ven, W.J. (1990) Structural homology between the human fur gene product and the subtilisin-like protease encoded by yeast KEX2. *Nucleic Acids Res*, **18**, 664.
- Van Rompaey, L., Ayoubi, T., Van De Ven, W. and Marynen, P. (1997) Inhibition of intracellular proteolytic processing of soluble proproteins by an engineered alpha 2-macroglobulin containing a furin recognition sequence in the bait region. *Biochem J*, **326 ( Pt 2)**, 507-514.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. and Citron, M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, **286**, 735-741.
- Velasco, G., Cal, S., Merlos-Suarez, A., Ferrando, A.A., Alvarez, S., Nakano, A., Arribas, J. and Lopez-Otin, C. (2000) Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res*, **60**, 877-882.
- Villeneuve, P., Feliciangeli, S., Croissandeau, G., Seidah, N.G., Mbikay, M., Kitabgi, P. and Beaudet, A. (2002) Altered processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in PC2 knock down mice: a biochemical and immunohistochemical study. *J Neurochem*, **82**, 783-793.
- Vinyals, A., Alia, P., Llorens, A., Adrover, M., Gonzalez-Garrigues, M., Masramon, L., Peinado, M.A. and Fabra, A. (1998) Detection of differentially expressed gelatinase A in metastatic and non-metastatic subpopulations of tumor cells by target RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction (TRAP-PCR). *Clin Exp Metastasis*, **16**, 603-611.
- Vleugel, M.M., Greijer, A.E., Shvarts, A., van der Groep, P., van Berkel, M., Aarbodem, Y., van Tinteren, H., Harris, A.L., van Diest, P.J. and van der Wall, E. (2005) Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1{alpha} expression in invasive breast cancer. *J Clin Pathol*, **58**, 172-177.
- Volchkov, V.E., Feldmann, H., Volchkova, V.A. and Klenk, H.D. (1998) Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5762-5767.
- Volmat, V., Camps, M., Arkinstall, S., Pouyssegur, J. and Lenormand, P. (2001) The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *J Cell Sci*, **114**, 3433-3443.
- von Bossanyi, P., Sallaba, J., Dietzmann, K., Warich-Kirches, M. and Kirches, E. (1998) Correlation of TGF-alpha and EGF-receptor expression with proliferative activity in human astrocytic gliomas. *Pathol Res Pract*, **194**, 141-147.
- von Marschall, Z., Riecken, E.O. and Rosewicz, S. (1998) Stromelysin 3 is overexpressed in human pancreatic carcinoma and regulated by retinoic acid in pancreatic carcinoma cell lines. *Gut*, **43**, 692-698.
- Vukovic, V., Haugland, H.K., Nicklee, T., Morrison, A.J. and Hedley, D.W. (2001) Hypoxia-inducible factor-1alpha is an intrinsic marker for hypoxia in cervical cancer xenografts. *Cancer Res*, **61**, 7394-7398.

- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. and Semenza, G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5510-5514.
- Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **270**, 1230-1237.
- Wang, X. and Pei, D. (2001) Shedding of membrane type matrix metalloproteinase 5 by a furin-type convertase: a potential mechanism for down-regulation. *J Biol Chem*, **276**, 35953-35960.
- Watanabe, M., Hirano, A., Stenglein, S., Nelson, J., Thomas, G. and Wong, T.C. (1995) Engineered serine protease inhibitor prevents furin-catalyzed activation of the fusion glycoprotein and production of infectious measles virus. *J Virol*, **69**, 3206-3210.
- Weeks, B.H., He, W., Olson, K.L. and Wang, X.J. (2001) Inducible expression of transforming growth factor beta1 in papillomas causes rapid metastasis. *Cancer Res*, **61**, 7435-7443.
- Wells, A., Kassis, J., Solava, J., Turner, T. and Lauffenburger, D.A. (2002) Growth factor-induced cell motility in tumor invasion. *Acta Oncol*, **41**, 124-130.
- Wenger, R.H. (2000) Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol*, **203**, 1253-1263.
- Wenger, R.H. (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *Faseb J*, **16**, 1151-1162.
- Wick, W., Platten, M. and Weller, M. (2001) Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J Neurooncol*, **53**, 177-185.
- Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.C., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Maxwell, P.H. (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood*, **92**, 2260-2268.
- Will, H., Atkinson, S.J., Butler, G.S., Smith, B. and Murphy, G. (1996) The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem*, **271**, 17119-17123.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A. and Hogan, B.L. (1995) Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev*, **9**, 2105-2116.
- Wood, S.M., Gleadle, J.M., Pugh, C.W., Hankinson, O. and Ratcliffe, P.J. (1996) The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. Studies in ARNT-deficient cells. *J Biol Chem*, **271**, 15117-15123.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. and Massague, J. (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, **370**, 341-347.
- Xu, X., Brodie, S.G., Yang, X., Im, Y.H., Parks, W.T., Chen, L., Zhou, Y.X., Weinstein, M., Kim, S.J. and Deng, C.X. (2000) Haploid loss of the tumor suppressor Smad4/Dpc4 initiates gastric polyposis and cancer in mice. *Oncogene*, **19**, 1868-1874.

- Yamakawa, M., Liu, L.X., Date, T., Belanger, A.J., Vincent, K.A., Akita, G.Y., Kuriyama, T., Cheng, S.H., Gregory, R.J. and Jiang, C. (2003) Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ Res*, **93**, 664-673.
- Yamashita, K., Discher, D.J., Hu, J., Bishopric, N.H. and Webster, K.A. (2001) Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J Biol Chem*, **276**, 12645-12653.
- Yana, I. and Weiss, S.J. (2000) Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell*, **11**, 2387-2401.
- Yanagisawa, K., Osada, H., Masuda, A., Kondo, M., Saito, T., Yatabe, Y., Takagi, K. and Takahashi, T. (1998) Induction of apoptosis by Smad3 and down-regulation of Smad3 expression in response to TGF-beta in human normal lung epithelial cells. *Oncogene*, **17**, 1743-1747.
- Yang, C., Dai, L., Liu, X.G., Chen, Q., Zhang, X.R. and Guo, M.Y. (2003) [Effect of transforming growth factor beta1/Smad signaling pathway on the expression and enzymatic activity of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in cultured rat mesangial cells]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, **32**, 553-557.
- Yeo, E.J., Chun, Y.S., Cho, Y.S., Kim, J., Lee, J.C., Kim, M.S. and Park, J.W. (2003) YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst*, **95**, 516-525.
- Yi, J.Y., Shin, I. and Arteaga, C.L. (2005) Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, **280**, 10870-10876.
- Yu, J., Ustach, C. and Kim, H.R. (2003) Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol*, **36**, 49-59.
- Yu, Q. and Stamenkovic, I. (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*, **14**, 163-176.
- Zambon, M.C. (2001) The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol*, **11**, 227-241.
- Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B.Z., Rubinstein, M. and Cohen, B. (1998) Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *Embo J*, **17**, 5085-5094.
- Zhang, Y., Feng, X., We, R. and Derynck, R. (1996) Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature*, **383**, 168-172.
- Zhang, Y.W., Su, Y., Volpert, O.V. and Vande Woude, G.F. (2003) Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12718-12723.
- Zheng, M., Seidah, N.G. and Pintar, J.E. (1997) The developmental expression in the rat CNS and peripheral tissues of proteases PC5 and PACE4 mRNAs: comparison with other proprotein processing enzymes. *Dev Biol*, **181**, 268-283.
- Zheng, M., Streck, R.D., Scott, R.E., Seidah, N.G. and Pintar, J.E. (1994) The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and

- carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity. *J Neurosci*, **14**, 4656-4673.
- Zhong, H., Agani, F., Baccala, A.A., Laughner, E., Rioseco-Camacho, N., Isaacs, W.B., Simons, J.W. and Semenza, G.L. (1998) Increased expression of hypoxia inducible factor-1alpha in rat and human prostate cancer. *Cancer Res*, **58**, 5280-5284.
- Zhong, H., De Marzo, A.M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L. and Simons, J.W. (1999a) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*, **59**, 5830-5835.
- Zhong, M., Benjannet, S., Lazure, C., Munzer, S. and Seidah, N.G. (1996) Functional analysis of human PACE4-A and PACE4-C isoforms: identification of a new PACE4-CS isoform. *FEBS Lett*, **396**, 31-36.
- Zhong, M., Munzer, J.S., Basak, A., Benjannet, S., Mowla, S.J., Decroly, E., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1999b) The prosegments of furin and PC7 as potent inhibitors of proprotein convertases. In vitro and ex vivo assessment of their efficacy and selectivity. *J Biol Chem*, **274**, 33913-33920.
- Zhou, B.P. and Hung, M.C. (2003) Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer. *Semin Oncol*, **30**, 38-48.
- Zhou, J., Callapina, M., Goodall, G.J. and Brune, B. (2004) Functional integrity of nuclear factor kappaB, phosphatidylinositol 3'-kinase, and mitogen-activated protein kinase signaling allows tumor necrosis factor alpha-evoked Bcl-2 expression to provoke internal ribosome entry site-dependent translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res*, **64**, 9041-9048.
- Zhou, J., Schmid, T. and Brune, B. (2003) Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *Mol Biol Cell*, **14**, 2216-2225.
- Zhou, S., Zawel, L., Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) Characterization of human FAST-1, a TGF beta and activin signal transducer. *Mol Cell*, **2**, 121-127.
- Zhu, X., Zhou, A., Dey, A., Norrbom, C., Carroll, R., Zhang, C., Laurent, V., Lindberg, I., Ugleholdt, R., Holst, J.J. and Steiner, D.F. (2002) Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10293-10298.
- Zucker, S. and Vacirca, J. (2004) Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **23**, 101-117.
- Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B., Stokoe, D. and Giaccia, A.J. (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev*, **14**, 391-396.



**ANNEXE #1 :**

**De :** jbc@asbmb.faseb.org  
**Répondre à :** jbc@asbmb.faseb.org  
**À :** <claire.m.dubois@usherbrooke.ca>  
**Date :** Wednesday, February 9, 2005 8:00 AM  
**Objet :** From the JBC re: Manuscript M5:01464

---

M5:01464

Dear Dr. Dubois:

We have received your manuscript entitled:

"TGFbeta1 induces HIF-1 through dual mechanisms involving inhibition of PHD2 expression and increase in HIF-1alpha transcription".

It has been given the number M5:01464 and has been assigned to:

Dr. Peggy J. Farnham  
UC Davis Genome Center  
Genome and Biomedical Sciences Facility  
University of California-Davis  
451 East Health Sciences Drive  
Davis, CA 95616-8816  
Tel: 530-752-3200  
Fax: 530-752-7710  
E-mail: pjfarnham@ucdavis.edu

Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur in the submission and that the final version of the manuscript has been seen and approved by all authors. Papers are published with the implicit understanding that you will pay charges at a rate of \$65.00 per page for all typeset pages.

\*\*\*\*\*

A detailed description of JBC's Editorial policies and practices can be found on the Journal's website at <http://www.jbc.org/misc/edpolicy.shtml>. These can be summarized as follows:

## **ANNEXE #2 :**

### **Description des techniques :**

#### **Cell lysates for immunoblotting:**

Cells were washed once with PBS, and lysed in RIPA buffer (1.5 M NaCl, 500 mM Tris-HCL, 10% NP40, 5% Na-Deoxycholate, 1% SDS, 50 mM EDTA, Mini Complete protease inhibitor) under rotation for 30 min. 50 µg of total protein content were applied on SDS-PAGE gels, transferred onto PVDF membranes (Roche), blocked 30 min in 5% milk/PBS and, probed overnight with primary antibodies. Immunoreactive bands were revealed by ECL detection system (Roche) using peroxidase-conjugated antibodies. Western blots using nuclear cell extracts were performed as described for total cell lysates (50 µg/lane of total nuclear protein extracts).

#### **Luciferase assays:**

Cells were transiently transfected by CaPO<sub>4</sub> precipitation technique using a Mammalian Cell Transfection Kit (Specialty Media, Inc., Lavallette, NJ) as previously described (Langlois et al., 1997). Briefly, twenty-four hours prior to transfection, cells were plated using a plating density of 150 000 cells/well in 6-well plates (Falcon Labware, Mississauga, ON, Canada) in complete media. Cells were fed fresh complete media 3-4 h before transfection. Cells were transfected with 2 to 4 µg plasmid/well and control wells were transfected with appropriate control vectors to compensate for potential squelching. Gently vortexed DNA/CaPO<sub>4</sub> precipitate suspension was added slowly, dropwise, while gently swirling the media in the plate. The plates were returned to the incubator until the

next morning when the cells were rinsed with PBS and serum-starved for 6-8 h prior to overnight stimulation with 0 to 5 ng/ml TGF $\beta$ 1. The cells were then lysed in 300  $\mu$ l/well of lysis buffer (25 mM gly-gly, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2 mM DTT, pH 7.8), and luciferase activity was measured over a 10 second interval using a Sirius luminometer (Berthold detection systems, Pforheim, Germany). Luciferase activity of 250  $\mu$ l of total protein extracts was assayed in the presence of 100  $\mu$ l of a 75 mM D-luciferin solution and 100  $\mu$ l of assay buffer (25 mM gly-gly, 12.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM EGTA, 12.5 mM Kphos dibasic, pH 7.6).

#### **Northern analysis:**

Aliquots of 5  $\mu$ g of total RNA were run on horizontal gel apparatus in 1% agarose gel containing 1x Mops and 6% formaldehyde submerge in 1x Mops buffer (pH 7.0). The samples were transferred onto a nylon membrane Hybond + (Roche) by overnight capillary action with 10x SSC. After blotting, the RNA was fixed with 0.05 N NaOH, and the membrane were stained in 0.02% methyle blue in 0.3 M sodium acetate (pH 5.5). The membranes were then prehybridized for 2h at 68°C with 1x hybridization buffer containing 120 mM Tris (pH 7.4), 600 mM NaCl, 8 mM EDTA (pH 8.0), 0.1% Na<sub>4</sub>PP, 0.2% SDS, 625  $\mu$ g/ml heparin, and 10% dextran sulfate. Hybridization began with the addition of the [<sup>32</sup>P] UTP-labeled cRNA probe, and was carried out overnight in one part 2x hybridization buffer and one part deionized formamide. The membranes were sequentially washed in 2x SSC/1% SDS at room temperature, 2x SSC/0.1% SDS at 68°C, 0.1 SSC/0.2% SDS at 68°C and 0.1x SSC/0.1% SDS at 68°C.

**Nuclear extract preparation and electrophoretic mobility shift assays:**

Cells were washed twice with PBS and were collected by gentle scraping in cold PBS containing 50 nM MG-132 and, centrifuged at 1000 x g for 3 min at 4°C. The resulting cell pellets were resuspended in ice-cold lysis buffer (10 mM HEPES (pH 7.90), 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM DTT, and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) containing an antiprotease mixture (50 nM MG-132, 1 mM PMSF, and 10 µg/ml each of aprotinin, leupeptin, and pepstatin A). After a 10-min incubation on ice, an equal volume of lysis buffer containing the antiprotease mixture as well as 0.2% NP-40 was added (to yield a final concentration of 0.1% NP-40). Samples were immediately vortex mixed for 15 s before centrifugation at 1200 x g (5 min at 4°C). The resulting nuclear pellets were washed once with lysis buffer containing the antiprotease mixture before being resuspended in ice-cold nuclear extraction buffer (20 mM HEPES (pH 7.90), 400 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, and 10% (v/v) glycerol) containing the antiprotease mixture. After a 20-min incubation on ice (with frequent mixing), samples were spun (15,000 x g for 15 min at 4°C), and supernatants (the nuclear extracts) were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. Protein concentrations were determined by Bradford assay. Nuclear extracts (amounts used are specified in the figure legends) were analyzed in EMSA as follows. Nuclear extracts were incubated in a modified binding buffer (20 mM HEPES (pH 7.50), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1% NP-40, and 6% glycerol) supplemented with 0.4 µg poly(dI-dC) and 8 µg acetylated BSA before the addition of 40,000 cpm of labeled oligonucleotide probe. For supershift experiments, binding reactions were conducted in the presence of specific antisera to HIF-1α (30 min at 4°C) before the addition of <sup>32</sup>P-labeled probes. Rabbit IgG

reagent grade antibodies (Sigma) were used as a control. Samples were electrophoresed on 6% acrylamide gels at 4°C in 0.5x TBE; dried gels were then exposed.